INTERZIS XEROX

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

VERONICA LAZĂR

MICROBIOLOGIE MEDICALĂ

NOTE DE CURS
ŞI
PRINCIPII DE DIAGNOSTIC MICROBIOLOGIC

BJ 236 162

EDITURA UNIVERSITĂȚII DIN BUCUREŞTI
2001

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Referenţi ştiinţifici: Prof. dr. Victoria Herlea
Prof. dr. Dana Iordăchescu

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ
BUCUREŞTI
COTA IV 517065
911

B.C.U. Bucuresti
C20017471

© Editura Universităţii Bucureşti
Şos. Panduri, 90-92, Bucureşti - 76235; Telefon/Fax: 410.23.84
E-mail: editura@unibuc.ro
Internet: www.editura.unibuc.ro

Tehnoredactare computerizată: Veronica Lazăr
Coperta: Imagine la microscopul optic a unor celule aparţinând unei tulpini enteropatogene de *Escherichia coli* aderate *in vitro* (*pattern* de aderenta: aderenta localizata) la linia celulară HEp-2 (Mărire: x 2500).

Descrierea CIP a Bibliotecii Naţionale
LAZĂR, VERONICA
Microbiologie medicală/ Veronica Lazăr - Bucureşti: Editura Universităţii din Bucureşti, 2001
288 p.
Bibliogr.
ISBN 973-575-574-2

579.61

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

CUPRINS

Introducere. Obiectul de studiu al Microbiologiei medicale 7

Scurt istoric 7

Situatia epidemiologica in lume si la noi tara 14

Microbiota organismului uman 18

Microorganisme autohtone ai alohtone 18

- Factorii favorizanti ai colonizarii cu microorganismele caracteristice microbiotei normale 19
- Microbiota normala a tegumentelor 20
- Microbiota normala a tubului digestiv 21
  - o Rolul fiziologic al microbiotei gastrointestinale 26
  - o Mecanismele rezistentei la colonizare.....28
  - o Microorganisme probiotice 30
  - o Rolul negativ al microbiotei gastrointestinale 31
    1. Microorganismele microbiotei normale – germeni oportunisti.....31
    2. Translocatia bacteriilor din intestin.....32
    3. Relatia cauza – efect intre microbiota normala – cancer.....32
- Microbiota normala a tractului respirator 35
- Microbiota normala a tractului genito-urinar 36

Relatiile dintre microorganisme si organismul-gazda 36

- Comensalismul 36
- Simbioza 36
- Oportunismul 37
- Parazitismul 39

Microorganisme patogene si proprietatile lor definitorii 40

1. Patogenitatea 40
2. Virulenta 41

- Factori de virulenta 42
  - Infectiozitatea 42
  - Agresivitatea 42
    - o Factori de difuziune.....43
    - o Agresine care interfera cu cu factori celulari si umorali bactericizi nespecifici 43

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- Enzime care favorizeaza invazia....43
- Factori care interfera cu raspunsul imun....44
- Rolul cationilor Fe3+ in virulenta....45

- Capacitatea de aderenta a bacteriilor la substrat 47

- Etapele procesului de aderenta bacteriana 47
- Adezinele bacteriene ca factor de virulenta si implicatiile imunologice ale caracterului lor antigenic 50

Principalele tipuri de adezine si rolul lor in virulenta....51
Fimbriile....51
Capsula....57
Glicocalixul. Placa dentara - modul de formare si consecinte....58
Flagelii....64
„Curli"....65
Stratul proteic S 66

- Receptorii de adezine. Integrine....68
- Semnificatia medicala a biofilmelor bacteriene....72

- Toxinogeneza 75
  - Exotoxine....76
  - Endotoxine si lipopolizaharide (LPS)....84

Conditiile de aparitie ale procesului infectios si clasificarea infectiilor 87

Conditiile de aparitie ale procesului infectios....87

1. Izvorul de infectie generator de agenti infectiosi....87
2. Calea de eliminare....87
3. Calea de transmitere....88
4. Poarta de intrare....88

Infectia – definitie si clasificare 89

Etapele unei infectii 92

Tipuri de evolutie epidemiologica a unei infectii 93

Principalele grupe de microorganisme patogene – caractere generale si diagnosticul de laborator al infectiilor determinate 95

Bacterii cu perete celular rigid

Coci Gram pozitivi 96

Fam. Micrococcaceae - G. *Staphylococcus*....96

Fam. Streptococcaceae - G. ***Streptococcus***....103

Bacili Gram pozitivi sporogeni....113

G. *Bacillus* – *B. anthracis*....113
- *B. cereus*....114

Bacili Gram pozitivi nesporogeni nefilamentosi

G. ***Corynebacterium***....116
Listeria monocytogenes 120

Bacili Gram pozitivi filamentosi 122

Actinomycetes (Actinobacteria)....122

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Coci Gram negativi 128

G. *Neisseria* - *N. meningitidis*..... 128

- *N. gonorrhoeae*..... 128

Bacili Gram negativi facultativ anaerobi drepti..... 131

Fam. *Enterobacteriaceae*..... 131

G. *Haemophilus*..... 152

G. *Bordetella*..... 154

G. *Legionella*..... 157

G. *Brucella*..... 160

Bacili Gram negativi facultativ anaerobi incurbati..... 162

G. *Vibrio*..... 162

G. *Campylobacter* si G. *Helicobacter*..... 166

Bacili Gram negativi aerobi..... 169

G. *Pseudomonas*..... 169

Bacterii anaerobe (Gram pozitive si Gram negative, bacili si coci)..... 172

G. ***Clostridium***..... 172

G. ***Bacteroides***..... 180

Bacili acidoalcoolorezistenti..... 182

Fam. ***Mycobacteriaceae***..... 182

Bacterii parazite obligat intracelular..... 188

Fam. ***Rickettsiaceae***..... 188

Fam. ***Bartonellaceae***..... 191

Fam. *Chlamydiaceae*..... 192

Bacterii cu perete celular flexibil..... 197

Treponema pallidum..... 197

Bacterii fara perete celular..... 200

G. Mycoplasma..... 200

Substante antibiotice. Fenomenul de rezistenta si multirezistenta la antibiotice 205

Notiuni generale de Micopatologie..... 215

A. **Levuri patogene – caractere generale si diagnosticul de laborator** 217

Candida albicans..... 218

Candida krusei..... 221

Cryptococcus neoformans..... 221

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Aderenta levurilor la substante inerte. Semnificatie medicala.....222
Diagnosticul de laborator al infectiilor determinate de levuri.....224
Alte specii de levuri patogene.....226
B. Fungi filamentosi patogeni – caractere generale si diagnosticul de laborator....229

Cls. *Phycomycetes*.....229
Cls. *Ascomycetes*.....230
- Micotoxicoze.....233

Principii de diagnostic microbiologic 235

Metode de diagnostic.....237
I. Diagnosticul microbiologic – etape.....237

Prelevarea si transportul probelor patologice 238

- Conditii particulare de recoltare si transport ale principalelor produse biologice recoltate in cazul bolilor infectioase.....239

Examenul direct (macro- si microscopic) al produselor patologice si culturilor obtinute prin insamântare pe diferite medii.....238
- determinarea tipului morfologic si a caracterului Gram 241
Examinarea caracterelor biochimice (biotipizare).....242

Interpretarea rezultatelor si identificarea agentului infectios -
- Sisteme de identificare 242
– chei dichotomice
- tabele de identificare
- identificare asistata de calculator
-Tipuri de teste biochimice utilizate in identificarea microorganismelor.....244
- teste individuale (de referinta)
- medii multitest
- sisteme microtest
Metode rapide de identificare/ detectare a bacteriilor.....244

Determinarea spectrului de sensibilitate la antibiotice a tulpinilor bacteriene izolate, prin tehnica antibiogramei.....247
Serotipizarea agentului patogen 247

Tipizarea fagica (lizotipie).....249

II. Diagnosticul imunologic (serologic) 249

III. Diagnosticul infectiilor si identificarea agentilor patogeni cu ajutorul tehnicilor moleculare.....251

Bibliografie.....253

ANEXE I – VIII - Chei dichotomice si tabele de identificare a microorganismelor.....267

ANEXA IX - Medii de cultura de uz microbiologic (retete).....275

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Introducere. Obiectul de studiu al Microbiologiei medicale

Microbiologia medicala este o ramura a microbiologiei generale care se ocupa cu **studiul microorganismelor patogene**, adica a celor dotate cu capacitatea de a initia un proces infectios când sunt indeplinite conditiile necesare, cum ar fi:

- un numar corespunzator de germeni;
- o poarta adecvata de intrare in organism;
- o anumita predispozitie a organismului gazda.

Microorganismele (bacterii, levuri, fungi, protozoare) sunt ubicvitare; din umarul mare de microorganisme existente in natura, un numar limitat sunt capabile sa se dezvolte in asociatie cu organismele superioare si dintre acestea un numar si mai redus (aprox. 550 specii) sunt patogene.

Scurt istoric. Bolile infectioase au suscitat un interes deosebit din cele mai vechi timpuri, datorita gravitatii lor si modului de propagare, care determina un mare numar de victime in comunitatile umane sau printre animale.

Hipocrat (400 i.Ch.), intemeietorul mediciniei, lua in considerare in geneza acestor boli participarea a doi factori: unul intrinsec, reprezentat de constitutia bolnavului si altul extrinsec, constând dintr-o alterare de natura necunoscuta a aerului, care devine prin el insusi nociv. Aceasta prima ipoteza asupra etiologiei bolilor infectioase a persistat mult timp sub forma *teoriei miasmelor* (gr. *miasma*= emanatie putrida, murdarie). Intr-o varianta mai concreta ea a fost formulata de Varon (100 i.Ch.), care considera ca alterarea aerului (de unde si termenul *malaria*= aer rau) se datora unor animale foarte mici, invizibile, care patrund in organism prin gura si prin nari.

Prima incercare de inlaturare a acestei conceptii, devenita nesatisfacatoare, se datoreaza lui Francastor (1488 - 1553), care a intuit una din caractristicile esentiale ale bolilor produse de microorganisme si anume contagiozitatea lor. Autorul mentionat considera ca boala este produsa

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

de particule mici si imperceptibile, numite seminte ale bolii (lat. *seminaria morbi)*, care trec de la un individ bolnav la altul santos. Fiind pur ipotetica, aceasta conceptie nu s-a putut impune până in epoca pasteuriana, când a fost dovedita experimental.

Louis Pasteur (1822 - 1895), in domeniul patologiei umane si animale, a sustinut si ulterior s-a si dovedit, ca orice boala infectioasa este rezultatul activitatii vitale a unui anumit microorganism specific, care se dezvolta ca parazit in organismul animal respectiv.

Cercetarile lui Pasteur consacrate viermilor de matase (1865-1870) au dus la identificarea agentilor patogeni a doua boli contagioase, pebrina si flaseria, la stabilirea modului de transmitere si a particularitatilor de evolutie, in diferitele stadii ale metamorfozei gazdei, ca si la stabilirea unor mijloace eficace de prevenire. Cercetarile sale au rezolvat problemele grave ale sericiculturii franceze, dar au reliefat totodata si importanta cercetatii experimentale a microorganismelor.

Descoperirea bacteridiei carbunoase in sângele animalelor moarte de carbune (Rayer si Davaine, 1850) nu au eliminat disputele dintre sustinatorii si adversarii *teoriei germenilor*, care considerau fie ca *Bacillus anthracis* este consecinta si nu cauza bolii, fie ca nu este un organism viu, ci fibrile de fibrina. Disputa a fost clarificata de R. Koch (1843-1910) care a demonstrat ca bacteridia carbunoasa este agentul patogen al bolii, pe care l-a cultivat *in vitro* in ser sanguin, studiind formarea de spori termorezistenti, alternanta dintre sporulare si germinare si caracterul specific al actiunii sale patogene, deosebit de la altor bacterii, precum si faptul ca infectia naturala a animalelor este rezultatul ingerarii de iarba contaminata cu germeni proveniti din sol. Rezultatele acestor studii asupra antraxului au fost publicate de catre Koch in 1876, intr-o lucrare in care se demonstra ca o bacterie este agentul cauzal al bolii, ceea ce a constituit o validare a *teoriei germenilor*.

Pasteur a confirmat rezultatele lui Koch asupra carbunelui, izolând si cultivând agentul patogen de la animalele bolnave si din solurile in care fusesera ingropate cadavrele acestora (implicând râmele in vehicularea sporilor si raspândirea bolii). Atras tot mai mult de patologia umana, Pasteur a demonstrat rolul bacililor anaerobi in etiologia gangrenei gazoase, al cocilor in furuncule, abcese, osteomielita si in febra puerperala, aducând alte dovezi in sprijinul *teoriei germenilor* care explica aparitia bolilor infectioase, concentrându-se apoi asupra modului cum, in anumite conditii, agentii infectiosi îsi modifica proprietatile de patogenitate si virulenta, pastrându-si antigenitatea, punând astfel *bazele stiintifice ale vaccinarii*. In 1885, Pasteur i-a injectat copilului Joseph Meister (la insistentele mamei acestuia), muscat de un câine turbat, o suspensie obtinuta din tesut nervos infectat (tesut cerebral de iepure infectat, uscat, triturat si resuspendat) cu scopul obtinerii protectiei antirabice. Pasteur a folosit termenul de « virus » cu

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

sensul de otrava, deoarece nu avea nici o idee asupra naturii agentului cauzal. Desi tratamentul a avut succes, experimentul insusi este considerat astazi ca o abatereare de la standardelor eticii cercetarii stiintifice.

Compatriotii l-au onorat pe marele savant francez, construind prin subscriptie publica la care au participat si straini, institutul care îi poarta numele - *Institutul Pasteur Paris* – inaugurat in 1888 si caruia i s-a dedicat pâna in ultimele sale zile.

Alte descoperiri importante ale lui Koch si discipolilor sai, care au marcat evolutia microbiologiei medicale:

- 1879 - Albert Neisser a izolat agentul patogen al gonoreei (gonococul) – *Neisseria gonorrhoeae*;
- 1883 – in cadrul unei expeditii intreprinse in Egipt si India, Koch a descoperit agentul cauzal al holerei – *Vibrio cholerae*; a obtinut pentru prima data cresterea in colonii pe felii de cartof si mai apoi pe medii solidificate cu gelatina, impreuna cu elevul sau Petri;
- 1883 - R. Koch a izolat si identificat bacilul care îi poarta numele (bacilul Koch), agentul patogen al tuberculozei umane -*Mycobacterium tuberculosis;* in 1884 publica lucrarea "Etiologia tuberculozei";
- 1885 - F. Escherich izoleaza colibacilul (*Escherichia coli)*, component al microbiotei intestinale normale;
- 1898 - K. Shiga izoleaza agentul patogen al dizenteriei bacilare – *Shigella dysenteriae*.

Pe baza cercetarilor sale, Koch a stabilit criteriile indispensabile pentru ca un microorganism izolat dintr-un organism afectat de o anumita boala infectioasa, sa poata fi considerat ca agent cauzal al bolii respective. Aceste criterii cunoscute sub numele de *postulatele lui Koch* , reprezentând o dezvoltare si o transpunere in termeni concreti a notiunii pasteuriene de *specificitate* a activitatii patogene microbiene, sunt urmatoarele:

1) microorganismul incriminat sa poata fi intotdeauna pus in evidenta in toate cazurile bolii respective, iar distributia lui sa sa corespunda leziunilor caracteristice bolii;
2) sa poata fi izolat in cultura pura pe medii artificiale;
3) dupa ce este cultivat *in vitro* mai multe generatii, sa reproduca boala si leziunile specifice la animalele sensibile, de la care sa poata fi reizolat.

Totusi Koch nu a putut reproduce holera la animale, observând el insusi o abatere de la postulate. Ideile sale au intâmpinat rezistenta, astfel un distins fizician din Munchen (Max von

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Petternkofer) a ridiculizat noua teorie si pentru a-i infirma valabilitatea a baut o cultura pura de *Vibrio cholerae,* suferind de o boala diareica acuta.

Ramase valabile pana astazi, chiar daca nu *ad literam*, aceste postulate au reprezentat si reprezinta inca un principiu de lucru, a carui respectare previne interpretarile eronate in materie de diagnostic bacteriologic sau de identificare a unor noi agenti patogeni.

Koch a adus in dezvoltarea microbiologiei ca stiinta contributii valoroase de ordin tehnic si teoretic, cum ar fi : conceptul de cultura pura derivata dintr-o colonie izolata (primele culturi pure au fost obtinute prin dilutii succesive, de medicul scotian Lister, cel care a aplicat pentru prima data si masuri de antisepsie), introducerea in practica microbiologica a mediilor de cultura lichide si solide, ceea ce a constituit un progres care a stat la baza microbiologiei moderne, deoarece a permis studiul culturilor pure in vederea evidentierii particulariltatilor lor de specie, a biologiei lor, a identificarii si incadrarii lor taxonomice. R. Koch a fost profesor la Universitatea din Berlin si distins cu premiul Nobel pentru medicina in 1905.

In 1890, Behring si Kitasato au anuntat descoperirea serului antitoxina difterica. Au injectat doze subletale de filtrat de cultura de bacil difteric la animale, obtinând un ser capabil de a neutraliza toxina. Au injectat apoi un animal neinfectat cu serul respectiv, pentru a preveni o infectie ulterioara. Pentru aceasta realizare, Behring a primit premiul Nobel in 1901.

In 1912, Paul Ehrlich (a fost cercetator in laboratorul lui Koch, unde a lucrat mai ales in domeniul imunologiei) a anuntat descoperirea unui medicament pentru tratarea sifilisului, considerat primul agent chemoterapeutic utilizat in tratarea unei boli bacteriene. A folosit un compus al arsenicului. Descoperirea sa a fost comunicata la Londra, unde s-au facut primele tratamente impotriva sifilisului , inainte de descoperirea penicilinei (Fleming era unul dintre putinii medici care îl administrau).

In 1929, Alexander Fleming a publicat prima lucrare asupra *penicilinei* (descoperita in 1928) si a efectului sau inhibitor asupra bacteriilor Gram pozitive. Aceasta descoperire este considerata unica, deoarece este un exemplu rar de liza bacteriana si nu doar de antagonism bacterian, exercitat asupra bacteriilor de catre specia de mucegai *Penicilium notatum*. Puterea antibacteriana si producerea penicilinei in cantitati importante (productia la scara industriala a inceput in 1943) a determinat disponibilitatea si utilizarea sa in terapia antiinfectioasa, deschizând « era antibioticelor ». Pentru aceasta descoperire, Fleming, impreuna cu Florey si Chain care au lucrat la purificarea si aducerea penicilinei intr-o forma stabila, cristalizata, au primit in 1945 premiul Nobel pentru Medicina si Fiziologie.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

In 1935, Gerhard J. Domagk (premiul Nobel in 1935) a utilizat pentru prima data un antimetabolit de sinteza, numit *Prontosil*, pentru a omorî streptococii la soareci. S-a demonstrat mai târziu ca Prontosilul este hidrolizat *in vivo* la un component activ - *sulfanilamida.*

In 1944, A. Schatz, E. Bugie si S. Waksman au descoperit *streptomicina* (premiul Nobel in 1952), antibiotic care va fi folosit in tratamentul TBC (boala infectioasa determinata de bacteria acidoalcoolorezistenta *Mycobacterium tuberculosis*). In plus, streptomicina a avut acelasi efect antibacterian specific asupra bacteriilor Gram negative, ca si penicilina asupra celor Gram pozitive.

In 1979 variola este declarata in mod oficial eradicata (ultimul caz de infectie naturala a fost semnalat in 1977 in Somalia). La eradicarea acestei boli grave a contribuit in mare masura campania de vaccinare lansata si finantata de O.M.S., dar si o particularitate a agentului patogen - virusul variolic (*Small Pox*), respectiv marea sa stabilitate genetica si antigenica.

In 1982, Prusiner Stanley a dovedit existenta unei clase de agenti infectiosi subvirali – *prionii*, agenti cauzali ai unor boli degenerative ale sistemului nervos central la animale si om, descoperire pentru care i s-a decernat premiul Nobel pentru Medicina (1997).

In 1983, Luc Montagner si Robert Gallo anunta descoperirea virusului imunodeficientei umane HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), agentul cauzal al sindromului de imunodeficienta dobândita (SIDA/AIDS).

In 1986, Kary Mullis utilizeaza o enzima termostabila de la *Thermus aquaticus* in tehnologia PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Enzima termostabila ADN-polimeraza replica moleculele de ADN de interes, in prezenta unor *primeri* oligonucleotidici complementari, reactia repetându-se in mai multe cicluri de replicare, care amplifica ADN-ul tinta. Pentru aceasta inventie autorului i s-a decernat in 1993 premiul Nobel pentru Chimie.

In 1995, Craig Venter, Hamilton Smith si Claire Fraser au elucidat secventa completa a primului genom bacterian la *Haemophilus influenzae*.

De-a lungul anilor, s-au observat mai multe exceptii de la postulatele lui Koch, astfel ca acestea au fost reformulate de A. S. Evans in 1976. Exceptiile se refera la urmatoarele aspecte: anumite bacterii (*Treponema pallidum, Mycobacterium leprae)* nu pot fi cultivate in laborator; pentru anumite virusuri nu erau initial gazde sensibile (HBV, VEB); pentru unele infectii perioada de incubatie este foarte lunga (boli prionice); exista situatii in care un microorganism patogen nu actioneaza singur, ci necesita cofactori genetici sau imunologici ai gazdei sau in care anumite forme de cancer sunt asociate cu anumite infectii virale; exista boli plurifactoriale (sindrom de oboseala postviroza, posibil de etiologie microbiana); anumite boli pot fi infectioase,

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

dar au o incidenta mica in populatie, la indivizi predispusi genetic (artrita reumatismala, diabetul juvenil).

In ultimii ani, s-a conturat o **versiune moleculara a postulatelor lui Koch**, atentia cercetatorilor deplasându-se de la identificarea bacteriilor care determina o anumita boala, spre caracterele care confera bacteriilor potentialul lor patogen. Nu exista inca un acord unanim asupra criteriilor care ar fi necesare si suficiente pentru a dovedi ca o anumita gena sau produsul sau joaca un rol important in procesul infectios, totusi anumite criterii au inceput sa se impuna :

- gena (sau produsul sau) sa fie prezenta la tulpinile patogene, nu si la cele avirulente ;
- daca gena este prezenta la bacterii care nu sunt cunoscute a determina boala, gena ar putea sa fi suferit o mutatie, devenind mai putin activa sau inactiva sau sa fie neexprimata in tulpinile avirulente ;
- indepartând gena dintr-o tulpina virulenta, aceasta sa aiba un grad de virulenta mai redus si alternativa, introducând gena clonata intr-o tulpina avirulenta, aceasta sa devina virulenta ;
- este necasar sa se demonstreze ca gena este exprimata de catre bacterii care se afla intr-un animal de laborator sau voluntar uman, la un anumit moment al procesului infectios ;
- produsul genei sa determine in organismul gazda producerea de efectori imunitari protectori - umorali si celulari (respectiv anticorpi si limfocite Tcitotoxice).

La noi in tara, fondatotorii Scolii Românesti de Microbiologie sunt doi savanti formati in laboratoarele Institutului Pasteur din Paris, respectiv Victor Babes (1854 - 1926) si Ioan Cantacuzino (1863 - 1934).

Victor Babes s-a format in laboratorul lui Pasteur, la Paris si ulterior in laboratorul lui Koch. Este fondatorul microbiologiei românesti, al catedrei de Microbiologie la Facultatea de Medicina din Bucuresti, membru corespondent al Academiei de Medicina din Paris. Având o formatie de medic anatomopatolog si abordând domeniul microbiologiei, si-a orientat cercetarile spre studiul relatiei agentilor patogeni cu organismul gazda, mai precis asupra modificarilor produse in tesuturile gazdei ca urmare a procesului infectios. A studiat turbarea si vaccinarea antirabica, lepra, numeroase parazitoze. A descoperit corpusculii Babes – Negri in celulele nervoase ale indivizilor morti de turbare (incluzii citoplasmatice eozinofile – aparute ca rezultat al replicarii virusului rabic si formarii de noi particule virale), corpusculii Babes – Ernst in bacilii difterici (incluzii deformante de volutina, situate la capetele bacililor care capata aspect de haltera – caracter patognomonic). Este initiatorul seroterapiei antidifterice (terapie cu ser provenit de la

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

animale vaccinate) la noi in tara. A descoperit noi specii microbiene patogene, intre care si *Babesia sp.*, agent etiologic zoonotic al babeziozei, la animale si om. A colaborat cu Victor Cornil la primul tratat de bacteriologie din lume, publicat in 1890. A fost fondatorul Institutului de Bacteriologie, care a fost in ordine cronologica al III-lea institut de bacteriologie din lume (azi Institutul « V. Babes »).

Ioan Cantacuzino s-a format in laboratorul lui Metchnikoff la Institutul Pasteur din Paris. A pus bazele Scolii Românesti de Microbiologie, la inceput in Laboratorul de Medicina Experimentala al Facultatii de Medicina din Bucuresti fondat in 1902, apoi in Institutul de Seruri si Vaccinuri, care îi poarta astazi numele si care face parte din reteaua Institutelor Pasteur din lume. A studiat patogenia tuberculozei, a holerei, a preparat vaccinul antitifoparatific, antivariolic a carui administrare in populatie (incepând din 1913) a contribuit la limitarea cazurilor de holera in tara noastra, vaccinul anticarbunos, antituberculos B.C.G. (tara noastra fiind a doua din lume in care s-a folosit acest vaccin). A contribuit la elaborarea primei legi sanitare din tara noastra.

Opera acestor savanti si profesori a fost continuata de urmasii lor, care s-au ridicat la inaltimea maestrilor, cum ar fi: C. Levaditi, S. S. Nicolau, N. Constantinescu (de numele acestor savanti se leaga perioada de inceput a dezvoltarii notiunilor clasice de virusologie – tropismul virusurilor, morfopatologia virozelor, cultivarea virusurilor in laborator, fiind cei care au pus bazele scolii românesti de Virusologie), M. Ciuca, D. Combiescu, C. Ionescu-Mihaesti, Alexandru Slatineanu, Petre Condrea si altii. Activitatea de cercetare si aplicativa in domeniu se desfasoara in prezent in institutele de profil : Institutul de Microbiologie « Dr. I. Cantacuzino » din Bucuresti, in Filiala acestui institut din Iasi (organizata de Prof. Petre Condrea) si in Institutul de Virusologie « Stefan S. Nicolau ».

Din Scoala Cantacuzinista provine Prof. dr. doc. G. Zarnea, membru al Academiei Române, care a cercetat biologia rickettsiilor si a participat in anii '50 la o campanie in teren in zonele endemice de tifos exantematic din Nordul Moldovei, contribuind la eradicarea acestei boli in tara noastra. Ca profesor si fondator al Catedrei de Microbiologie Generala din Facultatea de Biologie – Universitatea din Bucuresti, a contribuit la formarea a numeroase generatii de microbiologi. Este autorul lucrarii de referinta « Tratat de Microbiologie Generala », in cinci volume, aparut la Editura Academiei Române, intre anii 1983 - 1994.

Profesor dr. N. Cajal, membru al Academiei Române, a contribuit la dezvoltarea Institutului de Virusologie, la formarea multor specialisti in domeniu si la redactarea Tratatului de Virusologie Medicala, aparut la Editura Medicala (1990).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Situatia epidemiologica actuala in lume si la noi in tara

Secolul XIX a fost dominat de boli infectioase responsabile de o rata majora de morbiditate si mortalitate: **virale** – variola; **bacteriene** – tuberculoza, difteria, holera, lepra, febra tifoida.

Secolul XX a fost dominat de boli : **virale** - rujeola, poliomielita, SIDA; **bacteriene** – boli diareice, respiratorii, tuberculoza, tetanos; **parazitare** (malaria, amibiaza, schistosomiaza, filarioza, helmintioze).

Bacteriologia medicala se prezenta la jumatatea secolului XX ca o disciplina supravietuitoare, careia antibioticele (descoperite de Fleming in 1928 si a caror productie la scara industriala incepuse in 1943) trebuiau sa-i pună capat; azi se poate constata, dimpotriva, vitalitatea acestei discipline. Antibioticele s-au diversificat, au câstigat mai multa putere si specificitate, sunt utilizate in multe infectii, dar sunt inactive sau ineficace, atunci cand sunt incorect alese sau confruntate cu mecanisme de rezistenta noi, selectionate chiar prin antibioterapie. In prezent, bacterii "istorice" reapar si mediul natural sau spitalicesc furnizeaza noi patologii care gasesc teren de predilectie la subiectii cu imunodeficiente dobândite sau provocate. Infectiile nosocomiale sunt cauza unor boli de lunga durata si a spitalizarii prelungite. O serie de maladii suspectate a fi de origine infectioasa sunt in curs de cercetare :

- Maladia Kawasaki
- Maladia Crohn
- Sarcoidoza
- Osteomielita multifocala recidivanta a copilului
- Scleroza in placi
- Diabetul insulinodependent
- Sindromul de oboseala cronica
- Maladia Alzheimer
- Sindromul Guillain – Barré
- Rectocolita hemoragica

De exemplu, pe lânga numeroase boli neurologice care au o etiologie infectioasa evidenta (encefalite, meningite), anumite tulburari neurologice s-au dovedit a fi determinate de astfel de agenti infectiosi. Este cazul unor boli care initial au fost suspectate de a avea o etiologie infectioasa, dar agentul patogen a fost descoperit mult mai târziu (asa cum este cazul bolii neurologice Whipple, datorata infectiei cu bacteria *Tropheryma whippelii*) sau in acelasi timp (para–pareza spastica tropicala, secundara infectiei cu virusul *HTLV -1*), ca si al unor boli pentru

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

care o etiologie infectioasa nu a fost suspectata la data descrierii anatomoclinice, ci a fost demonstrata mai târziu in cadrul unei fiziopatologii complexe (sindromul Guillain – Barré, consecutiv infectiei cu *Campylobacter jejuni*). Exista si boli neurologice idiopatice, care pot fi corelate cu microorganisme binecunoscute sau inca necunoscute, in asociere cu anumiti factori de mediu si cu o sensibilitate genetica sau dobândita a gazdei.

In prezent, cei mai mari "ucigasi " sunt:

- Boala diareica acuta; boala diareica este o problema de mari proportii; se estimeaza ca in lume se produc anual 1 miliard de episoade diareice, dintre care 3,3 milioane de cazuri sunt fatale, ceea ce plaseaza bolile diareice pe locul doi in privinta cauzei mortalitatii prin boli infectioase; cele mai multe cazuri mortale se inregistreaza la copilul mic si in tarile in curs de dezvoltare (raport O.M.S., citat de Janda si colab., 1998). In ciuda acestor cifre alarmante, agentii etiologici ai gastroenteritelor infectioase ramân adesea nedetectati, investigatii epidemiologice recente raportând o rata de detectare a bacteriilor enteropatoge in materiile fecale care variaza intre 29,1% si 52,8%. Printre agentii enteropatogeni descrisi in ultimii ani figureaza agenti "reputati" , cum ar fi de exemplu *E. coli* enteropatogena, dar si unii mai noi: *E. coli* enteroaderenta, ca si unele bacterii considerate anterior ca simpli comensali ai tractului intestinal, printre care si o specie apartinând aceluiasi grup al enterobacteriilor – *Providencia alcalifaciens.*
- Bolile respiratorii acute care fac ~ 4,4 milioane de victime / an;
- Tuberculoza: O.M.S. considera ca situatia globala este scandaloasa – 1,7 miliarde de oameni infectati, din care mor ~3 milioane de indivizi /an, iar O.M.S. raporteaza ca 98% din decese se inregistreaza in tarile in curs de dezvoltare;
- Boli cu transmitere sexuala: 10 milioane persoane infectate/an si 3 milioane morti/ an;
  - boala SIDA face anual ~ 1 million victime, datorita infectiilor oportuniste cu bacterii, microfungi, paraziti si tumorilor maligne consecutive infectiei virale;
- Alte boli virale: hepatita virala cu virusul HBV face anual ~ 1 milion victime;
  - rujeola face anual ~ 1 milion victime;
- Boli parazitare - malaria – se inregistreaza 100 milioane de cazuri noi/an si ~ 2 milioane morti/an.

In legatura cu incidenta bolilor infectioase, in prezent a aparut conceptul de "iceberg", in

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

care vârful blocului este reprezentat de bolile infectioase clasice, zona mediana de boli mai putin severe, iar partea submersa, nevazuta, de infectiile asimptomatice prezente la indivizi care sunt purtatori de germeni patogeni, care îi infecteaza pe altii si realizeaza seroconversia acestora.

Situatia epidemiologica in Romania

Rapoartele recente ale Ministrului Sanatatii permit urmatoarele observatii :

- Se remarca o incidenta mare a bolilor infectioase, cum ar fi: infectii intestinale si toxiinfectii alimentare (TIA), boli respiratorii (bacteriene si virale), boli parazitare, boli cu transmitere sexuala (de exemplu,in prezent se apreciaza ca exista in România 1 million de femei infectate cu *Chlamydia sp.*)
- Se observa o incidenta mare a *infectiilor emergente* - boli a caror incidenta a crescut in ultimii 20 de ani (de ex., boli cu transmitere sexuala) si *reemergente* - boli a caror incidenta scazuse, dar este din nou in crestere, de ex. TBC - in prezent, cea mai mare endemie tuberculoasa din Europa este in Romania : 162 cazuri / 100.000 locuitori (comparativ cu 200 cazuri in total in Suedia, dintre emigranti);
- Pentru a avea o imagine mai clara a incidentei bolilor infectioase la noi in tara, sunt prezentate câteva date operative, extrase dintr-un buletin informativ al Min. sanatatii (« Centrul de Calcul, Statistica sanitara si Documentare medicala »/ 10/1999), care prezinta situatia comparativ in anii 1998 – 1999 :
    - in 1998 s-a inregistrat un numar mare de cazuri de toxiinfectii alimentare - 3142 cazuri, dizenterie bacialara- 3918 cazuri, rujeola- 9547 cazuri, rubeola- 23.529 cazuri, varicela- 50.691 cazuri;
    - in 1999 s-a inregistrat un numar mare de cazuri de boli diareice acute- 81.029 cazuri, infectii streptococice (angina streptococica- 15.023 cazuri, scarlatina – 3095 cazuri, erizipel – 2400 cazuri), hepatita virala tip A – 22.386 cazuri, parotidita epidemica–51.385 cazuri, meningita cerebrospinala – 396 cazuri, leptospiroze – 755 cazuri.
- **cauzele morbiditatii prin boli infectioase**: situatia demografica, educatia sanitara deficitara a populatiei, care influenteaza comportamentul alimentar, social, sexual;
- industrializarea si cresterea gradului de poluare a mediului;
- calatoriile internationale, comertul;
- slabirea controlului respectarii normelor de igiena;
- adaptarea micoorganismelor la mijloacele terapeutice antimicrobiene si selectia mutantelor rezistente ; cresterea virulentei agentilor patogeni.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Masuri de prevenire: monitorizarea calitatii mediului, care necesita si o infrastructura corespunzatoare; preventie prin vaccinare si educatia sanitara a populatiei; cercetare biomedicala aplicativa.

Antibioterapia – la o analiza facuta de catre Ministerul Sanatatii, s-au facut urmatoarele observatii:

- Antibioticele sunt folosite abuziv; se estimeaza ca 60% din cantitatea de antibiotice recomandate sunt nenecesare, ceea ce determina amplificarea fenomenului de antibiorezistenta, aparitia reactiilor secundare adverse si a bolilor iatrogene; in plus, fenomenul de automedicatie (antibiotice luate fara recomandarea medicului) este foarte raspândit in tara noastra, deoarece pot fi cumparate fara reteta medicala ;
- Se fac o serie de greseli medicale, cum ar fi:
    - se recomanda antibiotice pentru orice stare febrila, inainte de stabilirea diagnosticului clinic;
    - interpretarea gresita a datelor de laborator, administrarea de antibiotice inainte de a avea rezultatele;
    - administrare de antibiotice in lipsa inciziei si a prelevarii de produs patologic (puroi - în chirurgie), urmata de izolarea agentului cauzal al infectiei si determinarea sensibilitatii acestuia prin tehnica antibiogramei.

Microorganismele patogene sunt perfect adaptate pentru a coloniza si a se dezvolta in nisa ecologica reprezentata de gazda lor (uneori specifica) si de a supravietui mai mult sau mai putin in mediul extern in perioadele de existenta in afara gazdelor (in apa, aer, sol, alimente, vectori). Patogenitatea constituie rezultatul adaptarii microorganismelor patogene pentru o anumita gazda de-a lungul evolutiei, prin acumularea de modificari succesive prin mutatii, transfer de gene si selectie. In structura genetica a patogenilor exista gene cromozomale, plasmidiale sau fagice care le fac capabile sa infecteze anumite celule sau gazde si sa competitioneze cu mecanismele specifice si nespecifice ale imunitatii acestora, care in mod normal creeaza un mediu nefavorabil agentilor patogeni. Caracterul de patogenitate al microorganismelor este considerat in mod incorect ca fiind derivat din parazitismul lor, desi aceste proprietati nu sunt intotdeauna asociate. Dar intr-adevar, majoritatea bacteriilor patogene sunt parazite si facultativ saprotrofe, fiind capabile sa se dezvolte *in vitro* pe medii organice.

BIBLIOTECA

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Exista si microorganisme strict saprotrofe, cum ar fi bacteria *Clostridium botulinum* , care nu se poate dezvolta in organism, dar care poate fi patogena in mod indirect, printr-un produs metabolic, respectiv toxina botulinica (cea mai puternica toxina de origine biologica cunoscuta).

In anumite conditii, dar mai ales la gazde compromise din punct de vedere imunologic, chiar si unele microorganisme care fac parte din microbiota normala, pot determina ocazional boala, manifestandu-se ca microorganisme conditionat-patogene sau oportuniste.

Microorganismele patogene au doua proprietati caracteristice: *patogenitatea* si *virulenta*. Chiar daca exista tendinta actuala ca aceste notiuni sa fie utilizate ca sinonime, semnificatiile lor sunt totusi diferite : astfel, un microorganism este considerat patogen daca are potential capacitatea de a produce o boala, dar nu o face decât daca este suficient de virulent pentru a patrunde in organismul-gazda si pentru a contracara reactiile de aparare ale gazdei.

"Bacteriile patogene au un intreg arsenal de arme, care le permit sa invadeze un organism-gazda si sa produca boala. Problema este de a identifica armele din acest arsenal, importanta lor relativa, natura lor chimica si modul de actiune asupra gazdei" – H.Smith ; scopul urmarit este evident: prevenirea si tratamentul corect al bolilor infectioase.

Dar inainte de a trata despre particularitatile bacteriilor patogene care pot infecta si coloniza un organism-gazda, trebuie caracterizate mai intâi bacteriile care colonizeaza tegumentele si mucoasele organismului , fara a perturba starea de sanatate a acestuia. Numarul lor la omul adult este apreciat la 10^{14} celule, din care majoritatea sunt localizate in tubul digestiv. Contactul microorganismelor cu organismul uman (si animal) incepe chiar din momentul nasterii, un mare numar de contaminanti, mai ales tegumentari , fiind dobânditi din tractul genital matern. Desi organismele animale sunt sterile in cursul vietii intrauterine, in timpul nasterii si imediat dupa aceasta sunt colonizate.

Microbiota organismului uman

Microorganismele asociate cu organismul uman (animal in general) apartin la doua categorii :

1. **Microbiota normala** sau **autohtona**, asociata sau permanenta este reprezentata de microorganismele indigene sau autohtone, respectiv din specii a caror asociere cu o anumita specie animala a fost stabilita in cursul evolutiei comune. Ca urmare, ele sunt intâlnite datorita caracterului lor ubicvitar la majoritatea membrilor care fac parte din comunitatea respectiva. Totalitatea germenilor ce populeaza tegumentele si cavitatile naturale ale unui organism sanatos

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

alcatuiesc microbiota normala. Este reprezentata bacterii, microfungi si protozoare. Au fost propuse urmatoarele criterii pentru diferentierea microorganismelor autohtone, de cele straine :

- prezenta constanta la organismele conventionale, normale;
- colonizarea habitatelor specifice, succesiv, la animalele tinere;
- colonizarea anumitor regiuni particulare ale organismului;
- mentinerea la nivele stabile de densitate in comunitatile stabile, echilibrate, la animalele adulte.

2. **Microorganismele straine** sau **alohtone**, care pot fi intalnite in orice habitat normal, provin din mediul extern, respectiv din aer, sol, alimente sau de la alte animale. Unele dintre ele pot fi patogene. Adesea sunt doar in tranzit, fara sa contribuie semnificativ la activitatile ecosistemului, la ale carui conditii nu se pot adapta, ci in care pot doar supravietui temporar. Un microorganism alohton se poate localiza intr-o nisa eliberata de un autohton numai daca echilibrul acesteia este perturbat, aflat intr-o conditie anormala. Cand sistemul revine la normal, microorganismul autohton isi reocupa nisa, eliminand specia alohtona.

Diferitele compartimente ale organismului animal apartin din punct de vedere microbiologic la doua categorii principale: sterile si contaminate. O a treia categorie o formeaza cele la care starea normala este de sterilitate, insa ele pot fi contaminate temporar cu microorganisme al caror numar poate sa creasca in unele situatii, ajungand pâna la starea de infectie si boala consecutiva. In aceste cavitati in mod obisnuit sterile (laringe, trahee, bronhii, sinusuri nazale, esofag, stomac, portiunea proximala a intestinului subtire, tractul urinar superior) care pot purta o microbiota tranzitorie, prezenta microorganismelor si mai ales la un anumit nivel numeric, constituie o granita intre starea de sanatate si cea patologica. Microbiota inregistreaza o dinamica permanenta in raport cu conditia organismului-gazda, modificarile fiind atât de ordin cantitativ, cat si de ordin calitativ (compozitia in specii) in raport cu diferitele particularitati functionale ale acestuia legate de vârsta, sex, stare fiziologica.

Factorii favorizanti ai colonizarii cu microorganisme caracteristice microbiotei normale

Factorul determinant al colonizarii il constituie capacitatea microorganismelor de a adera la suprafata celulelor epiteliale, evitând astfel expulzarea lor. In acelasi timp aderarea la substratul celular stimuleaza cresterea si multiplicarea microorganismelor, datorita tendintei nutrientilor de a se concentra la interfata solid/lichid. Aderenta la un substrat celular are caracter de specificitate, in sensul ca epiteliile cu diferite localizari anatomice au capacitati de a recunoastere si de legare de bacterii diferite. Procesul se bazeaza pe interactiunea dintre adezinele bacteriene (structuri extraparietale specie-specifice) si receptorii complementari de pe suprafata

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

celulelor epiteliale ale gazdei, de natura glicoproteica sau glicolipidica. Pentru ca aderenta microbiana sa se poata produce, este necesar sa fie invinse mecanismele gazdei care se opun acestui fenomen, cum ar fi:

- producerea de sIgA care intervine in fenomenul de excludere imuna;
- sinteza de lizozim care inhiba aderenta;
- sinteza de analogi de receptori specifici (liberi, solubili) care se leaga de adezinele bacteriene, neutralizandu-le capacitatea de aderenta la celulele epiteliale (literatura de specialitate raporteaza si situatia inversa, in care bacteriile produc si elimina in mediu adezine solubile, care blocheaza situsurile combinative ale anticorpilor si implicit functia acestora, de recunoastere si marcare pentru distrugere a agentilor patogeni).

Pot interveni si alti factori accesori de inhibare a aderentei:

- efectul antibacterian al bilei neconjugate, ceea ce explica numarul mic al bacteriilor din intestinul subtire;
- producerea de catre gazda a unor proteine care leaga Fe, element indispensabil metabolismului bacterian;
- existenta unor situsuri anatomice convenabile pentru unele microorganisme si neconvenabile pentru altele (pH, potential redox).

Microbiota normala a tegumentelor

Tegumentul nu constituie o nisa ecologica favorabila cresterii microorganismelor, totusi regiunile axilara, inghinala, interdigitala ofera conditii de umiditate suficienta dezvoltarii microorganismelor. In restul zonelor, microorganismele sunt asociate glandelor tegumentare:

- glandele sudoripare sunt in general lipsite de germeni, dar daca traseul glandei este obstruat, se creeaza conditii pentru multiplicarea microorganismelor;
- glandele apocrine sunt glande modificate care se activeaza la pubertate, fiind colonizate cu microorganisme;
- foliculii pilosi sunt colonizati cu numeroase specii bacteriene, frecvente fiind: *Staphylococcus epidermidis, Corynebacterium acnes.*

Secretiile glandelor sebacee si sudoripare (pH= 4 –6) contin substante nutritive favorabiele cresterii bacteriilor : uree, aminoacizi, saruri, acid lactic, lipide, urme de vitamine, glucide.

Ca in orice habitat exista o microbiota rezidenta compusa din bacterii care supravietuiesc si se multiplica si o microbiota tranzitorie, care dispare in timp. Predominante sunt bacteriile Gram pozitive, pentru ca bacteriile Gram negative nu pot competitiona pentru substantele

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

nutritive; daca bacteriile Gram pozitive sunt eliminate prin tratament, se creeaza conditii pentru dezvoltarea celor Gram negative.

Tegumentul nou-nascutului este acoperit de o pelicula de *vernix caseosa,* dar colonizarea incepe in timpul expulziei. Daca initial pH-ul este neutru, devine acid dupa prima spalare, dar ramâne in continuare foarte sensibil la colonizarea cu germeni pentru ca lipseste microbiota normala, cu rol protector impotriva germenilor patogeni (*Staphylococcus aureus, Candida albicans*), ceea ce impune masuri de igiena sporita (spalari dese care indeparteaza bacteriile ajunse pe piele din foliculii pilosi).

Microbiota normala a tubului digestiv

1. Microbiota cavitatii bucale. Cavitatea bucala este un habitat complex; secretia salivara, prin continutul sau de 0,5% substanta uscata, reprezentata de : enzime, mucoproteine, proteine serice, substante antibacteriene (lizozim, lactoperoxidaza), substante anorganice (ioni fosfat si bicarbonat), nu constituie un mediu optim pentru dezvoltarea microorganismelor. Totusi suprafetele dentare sunt medii favorabile dezvoltarii bacteriilor inaintea eruptiei dentare; in acest habitat sunt prezenti streptococi si lactobacili facultativ anaerobi. Dupa aparitia dintilor predomina bacteriile anaerobe adaptate suprafetelor dentare si fisurilor gingivale. Bacteriile adera la smaltul dentar, iar proliferarea lor este dependenta de producerea glucanului (polimer insolubil al glucozei), care constituie o matrice in care bacteriile se multiplica si formeaza o pelicula pe suprafata dintilor, numita placa dentara (impregnata cu mucoproteine si saruri anorganice). Placa dentara rezista la periajul normal, atingând grosimi de 60 μm in zonele ascunse. In microhabitate anaerobe sunt prezente speciile *Streptococcus mutans* (care produce enzima glucozil-transferaza, responsabila de sinteza glucanului), *Actinomyces viscosus, Fusobacterium sp.* Pâna la crearea conditiilor anaerobe, placa dentara este populata de microorganisme aerobe, facultativ anaerobe, care consuma oxigenul creând conditii de anaerobioza. Aceste microrganisme fermenteaza glucidele cu producere de acid lactic, care hidrolizeaza hidroxiapatita din smaltul subiacent si conduc la aparitia cariei dentare. Prezenta fluorului in smaltul dentar, creste rezistenta acestuia la hidroliza. Rolul microbiotei bucale in cariogeneza a fost stabilit prin studii asupra animalelor axenica (*germ-free)*, care hranite fiind cu o dieta bogata in glucide, dar sterila, nu fac carii dentare.

In compozitia salivei exista si factori inhibitori ai aderentei celulelor prin intermediul glicocalixului, de suportul dentar:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- mucoproteinele salivare care competitioneaza cu cele bacteriene pentru situsurile de legare pentru bacterii la nivelul matricei placii dentare (au structuri chimice asemanatoare si afinitate mai mare pentru placa, decât bacteriile);
- sIgA care determina aglutinarea bacteriilor care devin astfel incapabile sa mai adere la suprafata dentara;
- fibronectina = glicoproteina (g.m. = 440 kDa) - in afara de cea serica, este prezenta si in saliva (secretata de glandele salivare), ca si pe suprafata celulelor epiteliale ale mucoasei bucale; are rol in aderenta bacteriilor Gram pozitive in special, la celulele mucoasei (prin cresterea activitatii proteolitice a salivei, fibronectina poate fi scindata, ceea ce favorizeaza aderenta bacteriilor Gram negative: *Pseudomonas sp.*, enterobacterii conditionat-nepatogene, responsabile de halena).

2. Microbiota normala a stomacului si intestinului

Colonizarea bacteriana a tractului gastrointestinal neonatal incepe in timpul nasterii, când nou-nascutul vine in contact cu cervixul matern si microbiota vaginala. La copiii nascuti prin cezariana, bacteriile colonizatoare ale tractului gastrointestinal provin din mediu. Primele bacterii prezente la majoritatea copiilor sanatosi, sunt facultativ anaerobe si acestea ramân predominante in timpul primelor doua saptamâni de viata. Speciile cele mai comune izolate din microbiota nou-nascutului la nastere, apartin genurilor: *Staphylococcus, Corynebacterium, Propionibacterium* si *Streptococcus.* Alimentatia pare sa moduleze *pattern*-ul de colonizare. La om, laptele matern joaca un rol in imunizarea pasiva a intestinului nou-nascutului si contine factori care stimuleaza cresterea speciei *Bifidobacterium bifidum* in intestin. Alimentatia artificiala stimuleaza implantarea si persistenta speciei *Clostridium perfringens.* Rezultatele sugereaza existenta unui antagonism intre *B. bifidum si C. perfringens*, care poate fi intensificat de tipul de alimentatie.

Tractul gastrointestinal, reprezentând o suprafata de aprox. 500 m^2, este principalul rezervor de bacterii, estimat la un numar de aprox. 10^{14} celule microbiene care contamineaza suprafetele corpului (constituit din 10^{13} celule) inca de la nastere. Variatii pronuntate in densitatile populationale bacteriene sunt observate la diferite nivele ale tractului gastrointestinal. Numarul bacteriilor ingerate este redus drastic datorita aciditatii gastrice. O densitate scazuta de microorganisme este mentinuta in intestinul subtire, mecanismul major de control al acestei populatii fiind motilitatea intestinala, care face ca organismele neaderate doar sa treaca prin intestin. Cele mai mari densitati de bacterii sunt gasite insa in colon.

Structura acestor compartimente care influenteaza colonizarea cu microorganisme este determinata de mucusul de pe mucoasa acestor cavitati, care contine mucoproteine si glicolipide.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Mucusul formeaza un film, o pelicula care se suprapune glicocalixului structural al celulelor epiteliale mucoase. Mucusul poate reprezenta un substrat nutritiv pentru acele microorganisme dotate cu un echipament enzimatic corespunzator. Continutul cavitar al stomacului si intestinului subtire proximal este steril, pentru ca microorganismele patrunse odata cu hrana si apa sunt omorâte de pH-ul gastric foarte acid. In pelicula de mucus insa sunt prezenti lactobacili si streptococi aerotoleranti. In acest compartiment pot fi prezente levuri apartinând genurilor *Candida* si *Torulopsis,* ca si un numar mic de bacterii anaerobe apartinând genurilor *Bifidobacterium, Peptostreptococcus, Clostridium, Veillonella.*

Bariera intestinala este un epiteliu format din mai multe tipuri de celule conectate prin legaturi strânse, reprezentate de : celule adsortive columnare, celule secretorii in forma de cupa, *celule M* si *celule Paneth.* Acest ultim tip de celule, rare pe suprafata epiteliului, sunt celule fagocitare care produc lizozim si alti produsi antimicrobieni si sunt situate la baza criptelor intestinului subtire, dar functia principala a acestor celule este de a secreta mucus care inveleste suprafata mucoasei intestinale. Majoritatea celulelor epiteliale sunt *celule columnare absortive*, ale caror functii majore sunt *conferirea caracterului de bariera epiteliala impermeabila fiziologic* si transportul nutrientilor. Pe suprafata apicala (luminala) a celulelor epiteliale intestinale se gasesc structuri bine definite - «microvili », proiectii digitiforme ale membranei acestor celule, sustinute de actina. Anumiti patogeni adera la microvili si nu deformeaza membrana. Alti patogeni altereaza suprafata apicala, adesea distrugând microvilii si furnizând astfel patogenilor o suprafata suplimentara de aderenta. *Salmonella sp.* denudeaza microvilii, celulele deformate devenind mai sensibile la invazia bacteriana.

Produsii metabolici bacterieni pot afecta viabilitatea celulelor-gazda sau functiile acestora, dar influenteaza si localizarea altor microorganisme in comunitatile aderente. Unele bacterii au capacitatea de a penetra membrana celulelor-gazda pe care le invadeaza. Astfel de patogeni invazivi pot fi enterobacteriile patogene (*Salmonella typhimurium*), dar si unii membri nepatogeni (conditionat-patogeni) ai microbiotei intestinale normale, care trec din lumenul intestinal in tesutul subepitelial, prin procese de endocitoza/exocitoza realizate de catre **celulele M (*microfold)*** din epiteliul care acopera placile Peyer (care sunt mai proeminente in ileum), diferite ultrastructural de celulele absortive invecinate. Anumiti patogeni ai mucoasei intestinale sunt incapabili sa adere la suprafata apicala a celulelor epiteliale polarizate; de ex., *Yersinia sp., Shigella sp.* interactioneaza specific numai cu suprafata bazolaterala a acestora, ceea ce constituie o curiozitate din moment ce aceasta suprafata nu este expusa patogenilor exogeni. Una din ipotezele care incearca sa explice fenomenul este aceea ca acesti patogeni atrag leucocitele

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

PMNN printr-un efect chimiotactic pozitiv, iar acestea, in miscarea lor catre bacterii, realizeaza brese in bariera epiteliala, desfacând jonctiunile strânse, moment in care bacteriile sunt internalizate sau patrund printre celule, ajungând la suprafetele bazolaterale ale acestora, la nivelul receptorilor specifici.

In contradictie cu necesitatea existentei unei bariere fiziologice (furnizata de celulele columnare), protectia gazdei prin procese imunologice necesita ca macromoleculele si microparticulele sa aiba o cale de penetrare a acestei bariere, spre sistemul limfoid asociat intestinului reprezentat de placi Peyer, foliculi limfatici izolati, apendice si noduli limfatici mezenterici (care alcatuiesc sistemul *GALT = gastric associated lymphoid tissue*).

Celulele M, un tip unic de celule, formeaza 10 % dintre celulele epiteliului intestinal la om si soarece si sunt dispersate intre celulele absortive si cele ale epiteliului asociat foliculilor limfatici, fiind atasate celulelor adiacente prin jonctiuni strânse. Suprafata apicala a celulelor M prezinta microvili scurti, neregulati, iar cea antiluminala este invaginata pentru a forma un buzunar central, in care migreaza limfocite si macrofage. Nivelele scazute ale continutului in enzime digestive al acestor celule cu marginea in perie este un indiciu ca functia lor esentiala nu este cea digestiva. Morfologia lor sugereaza functia de transport transepitelial a moleculelor nedigerate si a particulelor. Materialul transportat este probabil prezentat celulelor limfoide, rol sugerat de apropierea strânsa dintre aceste celule si diferite CPA (celule prezentatoare de antigen) care prelucreaza antigenele prezente in buzunarul lor central. Acest sistem de transport si prelucrare a antigenelor, devine o cale de invazie pentru unii patogeni enterici bacterieni care utilizeaza miscarea transepiteliala prin celulele M ca poarta de intrare prin bariera intestinala. Ex de astfel de patogeni : *Yersinia sp., Shigella flexneri, Salmonella sp. (*salmonelele pot patrunde si prin celulele columnare*), Campylobacter jejuni* , tulpini de *E. coli* enteropatogene.

Prin infectarea experimentala a iepurelui cu o tulpina enteropatogena de *E. coli* , s-au studiat la microscopul electronic de baleiaj modificarile produse ca urmare a aderentei bacteriilor la mucoasa intestinala (fig.1).

Microbiota intestinala complexa si relatiile sale cu organismul gazda au fost asemanate cu un ecosistem, in care micropopulatia indigena protejeaza organismele umane si animale impotriva colonizarii cu bacterii alohtone invadatoare. Inca din timpul lui Metchnikoff acest fenomen a fost observat si descris ca "antagonism bacterian", "efect de bariera" sau "rezistenta la colonizare". Prin activitatile lor metabolice, prin interactiunile dintre ele, ca si cu cele alohtone, microorganismele autohtone se opun aderentei si colonizarii mucoasei intestinale cu

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

microorganisme patogene (patrunse de la exterior odata cu alimentele, apa, aerul), contribuind prin aceasta la starea de sanatate a gazdei.

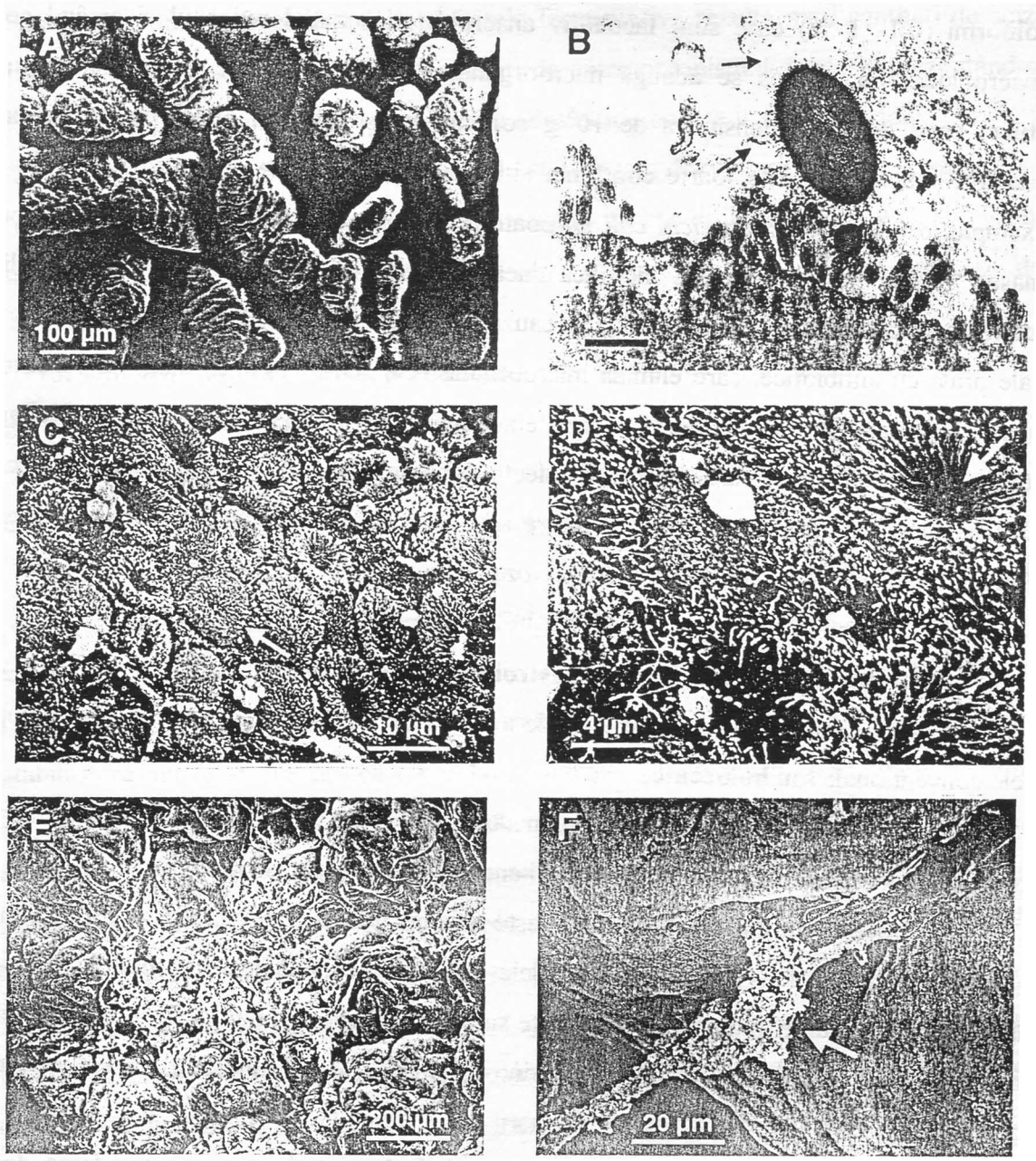


Fig. 1. Imagini la microscopul electronic de baleiaj (A, C - F) si de transmisie (B) ale unor fragmente de intestin de iepure, dupa 24 de ore de la infectia cu o tulpina de *E. coli* enteropatogena la iepure REPEC O103 ; A) - microvili ileali cu aspect normal ; B) – in timpul stadiilor timpurii ale infectiei, bacteriile exprima structuri de suprafata fibrilare care realizeaza o aderenta initiala laxa la celulele gazda epiteliale (bara=1µm); C si D - ca raspuns la infectie, microvilii enterocitelor de pe suprafata placilor Peyer prezinta structuri neregulate *bowl-like* (in forma de cupa sau bol); E – F – o retea de agregate de bacterii intim asociate unui material mucoid flocular sau filamentos care acopera o parte a epiteliului.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

3. Microbiota colonului. In intestinul gros microbiota realizeaza densitati mari (10^{11}/ g continut colonic), 99% dintre bacteriile componente fiind anaerobe (sute de specii, dintre care putine sunt cultivate si identificate). Conditiile de anaerobioza sunt create de *Escherichi coli* si germenii coliformi (0,1- 1 %) care sunt facultativ anaerobi, consumând oxigenul si creând conditii de anaerobioza. La acestea se adauga microorganisme alohtone, prezenta lor fiind semnificativa atunci cand depasesc densitatea de 10^6/g continut intestinal. Din punct de vedere calitativ si cantitativ microbiota este foarte constanta si rezista aportului de microorganisme exogene. De exemplu, o tulpina de *Escherichi coli* nu poate fi inlocuita de alta tulpina, chiar daca aportul este masiv. Aceste populatii se pot modifica daca au loc modificari biochimice ale epiteliului, sub influenta hormonala de exemplu. O alta cauza a modificarii microbiotei poate fi tratamentul pe cale orala cu antibiotice, care elimina microorganismele sensibile; daca dieta nu substituie aceste pierderi, se dezvolta microorganisme rezistente: specii de *Staphylococcus* si *Proteus,* dar si levuri (ex: *Candida albicans*) care determina infectii denumite candidoze postantibioterapie,ca rezultat al debalansarilor numerice *(disbioza)* dintre speciile microbiotei normale, care se gasesc in mod normal intr-o stare de echilibru, numita *eubioza.*

Rolul fiziologic al microbiotei gastrointestinale

A fost studiat si dovedit pe animale **axenice** (gr. *a* = fara, *xenos* = strain), comparativ cu cele conventionale sau **holoxenice**.

S-a dovedit experimental pe animale axenice ca microbiota normala, in special cea intestinala, poate exercita mai multe efecte benefice asupra organismului-gazda:

1) Microbiota intestinala normala este absolut necesara dezvoltarii normale a intestinului; o dovada in acest sens este ca la animalele axenice intestinul prezinta modificari anatomice si histologice, fiind aton si cu o functionalitate subnormala; efectele par sa fie legate de absenta unor metaboliti microbieni care stimuleaza, printr-un mecanism necunoscut, dezvoltarea normala a intestinului.

2) Microorganismele din microbiota intestinala sintetizeaza o gama larga de vitamine, cum ar fi: tiamina, piridoxina, acidul folic, acidul pantotenic, biotina, riboflavina, vitamina K si vitamina B_{12}. Nu se cunoaste exact in ce masura aceste vitamine sunt folosite si de organismul-gazda, deoarece locul lor de producere - mai ales colonul, nu este specializat in absorbtie.

3) Rolul microbitei intestinale in digestie este major in cazul mamiferelor rumegatoare, in timp ce la om acest rol este accesoriu; astfel procesul de digestie poate continua in colon sub actiunea microorganismelor pentru alimente nedegradate (pentru care nu exista enzime specifice)

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

sau degradate partial in etajele superioare (stomac, intestin subtire), cum ar fi celuloza, hemiceluloze, amidon, proteine, acizi nucleici, glucide cu molecula mica, ca de exemplu stahioza din fasole. La acestea se adauga si molecule endogene: imunoglobuline, constituenti ai celulelor epiteliale descuamate, mucus intestinal. Din procesele fermentative rezulta mari cantitati de acizi grasi , din care o parte sunt absorbiti si metabolizati de catre organismul-gazda, reprezentând o sursa importanta de energie in cazul persoanelor cu o alimentatie bogata in fibre vegetale.

4) Microbiota normala exercita si un efect de stimulare a dezvoltarii normale a sistemului imun si a mecanismelor imunitare ale gazdei. Se considera ca bacteriile indigene din organismul mamiferelor constitutie un set de antigene *quasi-self* cu un rol important in procesul de diferentiere al limfocitelor B.

5) Prin activitatile lor metabolice, prin interactiunile dintre ele, ca si cu cele alohtone, microorganismele autohtone se opun aderentei si colonizarii mucoasei intestinale cu microorganisme patogene, contribuind si prin aceasta la starea de sanatate a gazdei. Acest efect este denumit "efect de bariera" sau "rezistenta la colonizare".

O dovada in acest sens au adus studiile pe animale axenice (= *germ-free* = libere de germeni), care pot fi infectate foarte usor *per os* cu *Shigella flexneri* sau cu *Salmonella enteritidis,* doza infectanta minima fiind de 10 celule bacteriene ; acestea se localizeaza in intestin, se multiplica pâna ating o densitate maxima de 1 – 10 mld./ g continut intestinal in 12 – 24 h, dupa care se stabilizeaza numeric. In aceleasi conditii, animalele holoxenice, purtatoare ale unei microbiote normale complexe, elimina bacteriile infectante cu aceeasi viteza cu care indeparteaza un marker de control inert (spori apartinând unei tulpini termofile de *Bacillus subtilis* care nu germineaza in organismul gazda). Doza infectanta in acest caz este de 10^6 celule de *Salmonella enteritidis.* Acest fenomen prin care microbiota normala a unui organism holoxenic se opune colonizarii cu microoganisme alohtone, este denumit *efect de bariera* sau *rezistenta la colonizare* (Ducluzeau, 1970). Dupa unii autori, rezistenta la colonizare, numita si *excludere competitiva* este considerata un caz particular al efectului de bariera, constituind un mecanism exercitat de bacteriile intestinale indigene, care controleaza colonizarea intestinala de catre microorganismele patogene sau potential patogene si fiind considerat un mecanism esential pentru organismele compromise din punct de vedere imunologic. Se apreciaza ca rezistenta la colonizare ar manifesta trei grade de intensitate, care conduc la :

1) eliminarea rapida a microorganismelor straine ;
2) bariera permisiva, care asigura mentinerea temporara a microorganismelor alohtone, inofensive pentru gazda care devine astfel « purtator» ;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

3) efect curativ, de indepartare a microorganismelor straine dupa câteva zile – aceasta modalitate de raspuns poate fi exploatata in favoarea omului.

Datorita functiei de bariera, majoritatea incercarilor de implantare a unor bacterii straine sunt abortive. De exemplu, se recomanda consumarea de iaurt, produs de fermentatie care contine celule vii de *Lactobacillus bulgaricus*, postantibioterapie. Ori, bacteriile aparute in materiile fecale dupa tratament, nu sunt cele introduse (cu care se pot confunda), ci corespund unor tulpini indigene, a caror crestere si multiplicare este stimulata de alimentatia lactata.

Mecanismele rezistentei la colonizare sunt urmatoarele :

1) competitia microorganismelor indigene cu patogenii, are un rol esential si se datoreaza actiunii sinergice a mai multor bacterii din microbiota normala fata de cele alohtone ;

2) producerea de catre microorganismele indigene a unor metaboliti toxici, cum ar fi : acizi grasi volatili, substante inhibitorii ale cresterii ;

3) producerea de bacteriocine sau alte tipuri de substante antibiotice ; argument : streptococii α- hemolitici tip *viridans* din faringe, producatori de bacteriocine, impiedica implantarea speciilor patogene ; indepartarea streptococilor α- hemolitici cu antibiotice creeaza un vid ecologic si este urmata de colonizarea orofaringelui cu specii patogene, cum ar fi : *Streptococcus pyogenes, S. pneumoniae, S. agallactiae,* dar si *Neisseria meningitidis, Legionella pneumophila, Candida albicans ;*

4) producerea de modificari fizico-chimice ale mediului (pH, potential de oxidoreducere, metaboliti toxici) care fac anumite nise ecologice improprii pentru colonizare ;

5) inhibarea fenomenului de aderenta microbiana la substratul celular sensibil, o preconditie *sine qua non* a proceselor de colonizare si infectie consecutiva ; mecanismul are la baza competitia pentru situsurile de aderenta, fapt dovedit de numeroase observatii microscopice care au evidentiat celule bacteriene aderente la tegumente si mucoase ;

6) degradarea toxinelor bacteriei agresoare de catre microorganismele autohtone ; acest mecanism explica diferentele de toxicitate intre toxinele administrate *per os* si parenteral ;

7) competitia pentru nutrienti are un rol minor, microbiota intestinala utilizând substante din dieta (supuse hidrolizei, fermentatiei), nedegradate de enzimele gazdei.

Efectul de bariera antimicrobiana la nivelul tubului digestiv opune microbiota intestinala normala instalarii si proliferarii bacteriilor vii ingerate de catre gazda. In literatura de specialitate exista un numar restrâns de date privitoare la bacteriile care in tubul digestiv al unui organism holoxenic exercita un efect de bariera. Aceasta carenta a cunostintelor se explica prin necesitatea si dificultatea in acelasi timp de a dispune de animale axenice, care insamântate cu bacterii

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

cunoscute, devin organisme si modele de studiu gnotoxenice (- biotice), care permit evaluarea comparativa a efectului de bariera a diferitelor specii bacteriene. Astfel de modele sunt necesare pentru ca studiul *in vitro* al interactiunilor interspecifice la bacterii nu permite extrapolarea rezultatelor asupra interactiunilor care se petrec *in vivo* in tubul digestiv al animalelor gnotoxenice. De exemplu: *Shigella flexneri* este sensibila *in vitro* la aciditatea organica; *in vivo,* prin asocierea speciei *S. flexneri* cu *Bacteroides sp.,* care produce acid acetic in cantitati suficiente pentru a inhiba *in vitro* dezvoltarea unei culturi de *S. flexneri,* se constata lipsa oricarui efect inhibitor exercitat de *Bacteroides sp.* asupra *S. flexneri.* In alte cazuri efectul de bariera se manifesta atât *in vitro* cât si *in vivo :* anumite tulpini de *E. coli* fata de *S. flexneri.*

Dar nici modelele gnotoxenice (respectiv dixenice) nu sunt echivalente celor holoxenice ; un argument in acest sens il constituie faptul ca *E. coli* elimina *S. flexneri* in soarecii dixenici, dar nu si in cei holoxenici; la soarecii holoxenici este stabilit ca bacteriile cu efect de bariera impotriva speciei *S. flexneri* sunt anaerobe stricte sporulate, care fac parte din micropopulatia dominanta a tubului digestiv (acestea exercita si un efect de bariera drastic impotriva bacteriei anaerobe patogene *Clostridium perfringens*).

Nu intotdeauna primul ocupant al tubului digestiv are efect de bariera; astfel, celulele de *Lactobacillus casei* dintr-un preparat comercial sunt eliminate de catre *E. coli.*

Astfel de studii evidentiaza si alte aspecte ale efectului de bariera: *Bacillus licheniformis* produce *in situ* in partea superioara a tubului digestiv (stomac sau duoden) o substanta antibiotica asemanatoare bacitracinei, inhibitoare a colonizarii cu *Clostridium perfringens.* Când acest antibiotic este produs *in situ* nu se observa niciodata aparitia de mutante rezistente la acest antibiotic. *B. licheniformis* asociat cu *Lactobacillus sp.* nu mai produce acest antibiotic, desi supravietuieste in numar mare. Uneori este importanta si ordinea in care se face colonizarea: de exemplu, daca prima bacterie colonizatoare este *C. perfringens* si apoi *B. licheniformis,* aceasta nu produce antibioticul, cele doua bacterii coexistând fara sa interfere. Efectul de bariera poate fi modificat de dieta gazdei (fermentarea lactozei in cecum cu producere de acid lactic; glucoza este rapid absorbita si astfel efectul sau este diferit).

Un alt tip de efect de bariera (al carui mecanism este necunoscut) se manifesta prin persistenta unei tulpini date in micropopulatia subdominanta ; un exemplu in acest sens il ofera *E. coli* care nu este eliminata, dar marimea populatiei nu depaseste densitatea de 10^6 celule/ g de materii fecale proaspete (maximum 1% din totalul microbiotei intestinale), acesta fiind considerat un efect de bariera permisiva. In concluzie, anumite bacterii intestinale exercita in ecosistemul gazda – microbiota tubului digestiv fie un efect drastic conducând la eliminare, fie permisiv

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

asupra bacteriilor exogene, efectul permisiv manifestându-se in special asupra bacteriilor potential patogene. Acest mecanism de aparare de care dispune gazda pentru a se opune agresiunilor bacteriene este inca insuficient explorat. In domeniul microbiologiei medicale, s-a conturat in ultimul timp o conceptie ecologica in studiul agentilor infectiosi in interactiune cu gazda lor.

Importanta functiei de bariera antiinfectioasa este demonstrata de numeroase observatii :

- microbiota intestinala inhiba cresterea unor patogeni importanti, cum ar fi : *Vibrio cholerae, Salmonella sp., Shigella dysenteriae ;* suprimarea microbiotei normale cu antibiotice reduce semnificativ rezistenta fata de aceste bacterii patogene ;
- suprimarea microbiotei bucofaringiene normale cu antibiotice este urmata de instalarea prompta a unor bacterii patogene : *Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Neisseria meningitidis.*
- microorganismele rezidente in regiunea endocervicala uterina (*Lactobacillus sp., Corynebacterium sp., Streptococcus sp., Neisseria sp., Candida albicans)* inhiba activitatea metabolica si implantarea speciei patogene *Neisseria gonorrhoeae ;*

Rolul de bariera antiinfectioasa, ca si cel de stimulare a mecanismelor imunitare (demonstrat la animalele axenice care au fagocite hiporeactive, leucopenie, tesut limfoid subdezvoltat, titru scazut de anticorpi si interferoni) demonstreaza ca microbiota intestinala normala protejeaza organismul gazda fata de infectiile cu un numar moderat de patogeni enterici, patrunsi pe cale bucala.

Intre speciile permanente se pastreaza proportii constante, microbiota având un grad de stabilitate, manifestata intre altele si prin dificultatea implantarii de tulpini noi. Populatiile de microrganisme din sistemul digestiv impreuna cu gazda alcatuiesc un sistem ecologic, al carui echilibru este absolut necesar pentru sanatatea individului, fapt demonstrat de abolirea acestui efect prin administrarea de antibiotice.

Din punct de vedere ecologic, declansarea unei infectii bacteriene intestinale este consecinta a doua fenomene care au loc simultan : 1) patrunderea unui agent infectios in intestin ; 2) supresia efectului de bariera si a functiei sale de se opune implantarii si multiplicarii bacteriilor patogene. Cunoasterea mai in detaliu a bacteriilor cu rol de bariera, a substantelor produse, constituie premise pentru eliminarea unui efect nedorit, ca si pentru implantarea unei tulpini adecvate la nou-nascut.

Microorganisme probiotice. Termenul a fost utilizat pentru prima data in 1965 si se utilizeaza inca, desi semnificatia sa a variat in timp; in 1974 prin acest termen se intelegea orice supliment alimentar cu efect asupra gazdei, prin modificarea microbiotei intestinale. In 1989

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Fuller a dat o alta acceptiune termenului: orice organism viu adaugat alimentelor, care influenteaza benefic organismul gazda, prin ameliorarea echilibrului microorganismelor din tubul digestiv . Preparatele probiotice, sub diferite forme (capsule, granule sau suspensii adaugate in hrana), pot contine unul sau mai multe tipuri de bacterii, cum ar fi : *Lactobacillus bulgaricus, L. acidophilus, L. casei, L. helveticus, L. lactis, L.salivarius, L. plantarum, Bifidobacterium sp., Streptococcus termophilus.* Modul lor de actiune este direct, printr-un efect antagonist datorat producerii de substante antimicrobiene (acizi organici care determina scaderea pH-ului, H_2O_2, substante *bacteriocine – like,* biosurfactanti), competitiei pentru nutrienti sau pentru situsurile de atasare la substratul celular, care previne colonizarea acestuia cu bacterii patogene (adera si celule de lactobacili omorâte). Probioticele mai pot actiona prin modificari metabolice sau prin stimularea imunitatii (activarea macrofagelor, stimularea sintezei de anticorpi).

Efecte : -stimularea cresterii organismului gazdei (prin imbunatatirea conversiei hranei si protectie impotriva infectiilor intestinale, contribuind la reducerea ratei morbiditatii si mortalitatii) ;

- inlocuirea antibioticelor si aditivilor chimici sintetici la animalele de crescatorie ;
- atenuarea fenomenului de intoleranta la lactoza (prin deficit de β- galactozidaza) ;
- se considera ca speciile de *Lactobacillus* ar avea si un efect anticancerigen (prin supresia nitrat-reductazei si a formarii nitrozaminelor) ;

Exista si situatii in care microorganisme care nu fac parte din ecosistemul tubului digestiv pe care il tranziteaza, exercita totusi un efect antagonic (preventiv sau curativ) :

- administrarea preventiva a speciei *Saccharomyces boulardii* reduce mortalitatea sobolanilor gnotoxenici inoculati oral cu *Clostridium difficile*, la care se observa scaderea productiei de citotoxina, in timp ce numarul celulelor este putin modificat ;
- glucanul din peretele celular al levurilor (*Saccharomyces cerevisiae*) activeaza complementul si fagocitele, având un efect protector in infectiile bacteriene, fungice si parazitare ;
- produsii de metabolism stimuleaza cresterea lactobacililor indigeni.

Rolul negativ al microbiotei intestinale

1. **Microbiota colonului este semnificativa pentru patologie**, determinând complicatii severe atunci **când integritatea peretelui celular este compromisa**, cum ar fi : apendicite, diverticulite, infectii postoperatorii, multe dintre acestea fiind de origine endogena si aparând dupa interventiile chirurgicale pe tubul digestiv. Multe dintre bacteriile indigene se pot comporta

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

ca « «oportuniste », determinând complicatii mai ales la persoanele imunosupresate, sau ca « invadatori secundari » dupa unele infectii grave.

2. **Translocatia bacteriilor din intestin** este un fenomen de trecere a bacteriilor din lumenul intestinal in ganglionii mezenterici, prin epiteliul intestinal intact, mai exact prin enterocite (celulele absortive), spre membrana bazala a mucoasei intestinale, ajungând in canalele limfatice sau direct in ficat si alte organe, pe cale vasculara. Mai rar, este posibila migrarea retrograda, in plamân. Translocatia este urmata adesea de localizarea bacteriior in diferite situsuri extraintestinale si are loc mai ales la persoanele imunosupresate, expuse unor traumatisme mari sau unor interventii chirurgicale, conducând la complicatii infectioase grave, adesea sistemice si cu o rata mare a mortalitatii.

Fenomenul este semnalat exclusiv la bacteriile aerobe, facultativ anaerobe, cum ar fi : *E. coli, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis, Enterococcus sp., Streptococcus sp., Lactobacillus sp., Staphylococcu sp., Candida albicans.* La acestea se adauga *Salmonella sp., Listeria monocytogenes* care supravietuiesc sau se multiplica in macrofage, putând sa fie transportate in situsuri extraintestinale. Bacteriile strict anaerobe nu sunt translocate in mod normal, dar pot fi translocate impreuna cu bacteriile strict si facultativ aerobe, la organismele la care integritatea mucoasei intestinale este grav afectata (prin iradiere masiva, arsuri grave, ischemie mezenterica acuta) si abolite mecanismele care controleaza translocatia selectiva.

Bacteriile anaerobe nu se pot lega de situsurile receptoare ale enterocitelor, ci pot migra doar prin epiteliul lezat. Raportul dintre bacteriile anaerobe si cele aerobe (strict sau facultativ) in intestin variaza intre 100 : 1 si 1000 : 1, ceea ce demonstreaza ca translocatia nu este dependenta de densitate. Rolul bacteriilor strict anaerobe in ecologia intestinala este acela de a limita multiplicarea excesiva si translocatia bacteriilor aerobe potential patogene si colonizarea unor situsuri extraintestinale, prin mecanismul rezistentei la colonizare. Din acest unghi de vedere, translocatia ar fi determinata de incapacitatea bacteriilor strict anaerobe de a-si exercita aceasta functie de control.

3. Demna de analizat este si **relatia cauza – efect intre microbiota normala – cancer**; s-a sugerat adesea ca bacteriile intestinale pot juca un rol in initierea cancerului de colon, prin producerea de carcinogeni, cocarcinogeni si procarcinogeni. In aceasta relatie se poate vorbi de o corelatie directa sau indirecta.

Corelatie directa. Astfel, in etiologia maladiei Whipple, numita initial lipodistrofia intestinala sau histioreticuloza grava intestinala, caracterizata din punct de vedere anatomic prin depozite de grasime in ganglionii mezenterici si clinic prin steatoree, ascita chiloasa, poliartrita, subfebrilitate,

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

denutritie progresiva, pigmentatia mucoasei bucale, manifestari neurologice, a fost implicata bacteria *Corynebacterium anaerobium*, identificata in 1992 prin metode moleculare (PCR) ca o specie noua, denumita *Tropherima whippelii*.

Corelatie indirecta. Se accepta ca majoritatea cancerelor umane au in etiologia lor si un factor de mediu; astfel, multe forme de cancer sunt legate de alimentatie . Microbiota intestinala joaca un rol cheie ca intermediar in aceasta relatie, producând in cursul metabolismului substante cancerigene si promotori. De exemplu, **metabolismul unor aminoacizi** poate conduce la aparitia unor compusi cancerigeni :

-metionina *in vitro* este metabolizata sub forma analogului sau S-etil etionina, de catre unele specii bacteriene (inclusiv specii componente ale microbiotei intestinale normale), când sunt cultivate pe medii cu saruri minerale si glucoza , imbogatite cu sulfati si metionina. Se pare ca etionina ar avea un rol in cancerogeneza colonului ;

- tirozina este metabolizata de catre microbiota intestinala, rezultând fenoli volatili (fenol, p-crezol, 4-etil-fenol), care sunt absorbiti din intestin si excretati in urina. Un om sanatos excreta 50 – 100 mg de fenoli volatili urinari/zi (mai ales p-crezol). S-a demonstrat experimental ca aplicarea locala de fenoli induce dezvoltarea cancerului de piele la soareci. Fenolii volatili produsi de bacterii au fost pusi in evidenta in sucul intestinal, urina si fecale la bolnavii care contin in intestinul gros o populatie bacteriana foarte abundenta si cantitatea lor este in functie de alimentatia proteica si de durata tranzitului intestinal ;

- triptofanul este metabolizat in ficat si sub influenta microbiotei intestinale, produsii rezultati fiind eliminati in urina. Anumiti cercetatori afirma ca metaboliti ai triptofanului ar fi implicati in producerea cancerului vezicii urinare la om.

Formarea N-nitrozo compusilor – rezulta *in vivo* din nitriti si compusi aminati, in mediu acid sau neutru, sub actiunea enzimelor bacteriene. Aceasta transformare poate avea loc oriunde, daca nitritii, compusii aminati nitrozabili si bacteriile coexista. N-nitrozaminele au fost puse in evidenta in saliva, stomac, colon, vezica urinara si vagin, dar sunt retinute datorita caracterului lor organotrop, numai daca sunt activate local. Studii epidemiologice au ajuns la concluzia ca in zonele unde se consuma cantitati mari de nitrati, incidenta cancerului gastric este mai mare decât la persoanele cu dieta saraca in nitrati. Nu se stie daca stomacul este organul tinta pentru toate nitrozaminele produse in organism sau daca nitrozaminele produse la acest nivel sunt activate local de microbiota gastrica. Prin alimentatie se consuma in general o cantitate mica de nitriti, dar nitratii aflati in alimente in cantitati destul de mari, sunt redusi la nitriti de catre unele specii bacteriene (de ex. enterobacterii). Prin cuplarea nitritilor cu aminele alimentare si cu cele secundare utilizate ca prezervanti, rezulta *nitrosamine* cancerigene. Dupa unii autori, riscul ar fi minor deoarece nitratii ar fi absorbiti inainte de a ajunge in contact cu microbiota intestinala . N-

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

nitrozo compusii (N-nitrozamine care sunt organotrope si induc tumori in organele specifice si N-nitrozamide care sunt direct cancerigene) formeaza un grup de substante cu puternic efect carcinogen asupra tuturor speciilor animale testate, fiind astfel greu de crezut ca specia umana ar face exceptie.

Etiologia cancerului colo-rectal este explicata in prezent prin ipoteza multifactoriala, riscul individual pentru aceasta boala fiind determinat de factori genetici, dar aparitia acestei forme de cancer ar putea fi mediata si de bacterii, in functie de factorii alimentari. Incidenta cancerului de colon si a colopatiilor este redusa la populatia care consuma o dieta bogata in fibre vegetale, comparativ cu cea care au o alimentatie bogata in grasimi animale si proteine. Regimul alimentar, mai precis carnea si grasimile, se pare ca participa la geneza acestei boli, desi nu au fost detectate substante alimentare carcinogene care sa explice distributia cazurilor. De exemplu, cantitati mari de grasimi in dieta, determina preponderenta speciilor bacteriene intestinale capabile sa descompuna aceste substante. Experimental, s-a reusit sa se sintetizeze un compus aromatic policiclic din steroizii biliari, care devine cancerigen sub actiunea bacteriilor anaerobe din microbiota intestinala: *Bacteroides fragilis, Clostridium paraputrificum, Clostridium butyricum.* In zonele cu incidenta scazuta a cancerului de colon se gaseste un numar mai mic de germeni anaerobi din genul *Bacteroides* si un numar mai mare de enterococi (*Enterococcus faecalis*) – germeni aerobi, facultativ anaerobi.

S-au realizat studii privind rolul microbiotei intestinale si al compozitiei acesteia, la populatii care prezinta un risc crescut de cancer de colon, corelat cu tipul de dieta specifica la loturi de indivizi apartinând populatiei japonezo-hawaiene cu polipi si la loturi martor de indivizi japonezo-hawaieni cu dieta de tip occidental, caucazieni cu dieta de tip occidental si japonezi din mediul rural cu dieta de tip traditional. Densitatea mare a populatiilor de *Bacteroides sp.* si surprinzator, *Bifidobacterium sp.,* au fost asociate cu un risc crescut pentru aparitia cancerului de colon. Anumite specii de *Lactobacillus* si specia *Eubacterium aerofaciens* (bacterie anaeroba) care de asemenea produce cantitati importante de acid lactic, s-au dovedit a fi asociate cu un risc scazut in aparitia cancerului de colon.

De asemenea, s-au efectuat studii comparative privind compozitia in specii a microbiotei intestinale dominante la bolnavii cu cancer de colon, cu alte cancere in afara localizarii gastro-intestinale si cu boli nemaligne. Bolnavii cu cancer de colon si cu boli nemaligne nu difera in privinta numarului total de aerobi si anaerobi. La bolnavii cu cancer de colon predomina microbiota aeroba si scade numarul cocilor anaerobi, ca si a bacteriilor din genurile *Eubacterium* si *Fusobacterium.* S-a demonstrat ca speciile aerobe pot sa produca mai usor amine, decât

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

bacteriile anaerobe nesporulate. Bacteriile aerobe asigura substratul de amine, care intra apoi in reactia de nitrozare cu nitratii.

Exista date care arata ca infectiile bacteriene acute la bolnavii cancerosi ar influenta favorabil desfasurarea bolii si supravietuirea, iar administrarea de vaccinuri bacteriene (imunomodulatori de tipul *Cantastim, BCG, Corynebacterium parvum*) ar avea avea un efect mai bun, comparativ cu infectiile naturale. Datele epidemiologice din „era antibioticelor" arata ca in tarile dezvoltate si in curs de dezvoltare, pe masura ce incidenta infectiilor a scazut, incidenta cancerului a crescut. Literatura de specialitate mentioneaza date privitoare la frecventa scazuta a metastazelor in cazurile de melanom din Africa, unde incidenta tumorii primare este mare, dar adesea leziunile sunt suprainfectate si ulcerate. Aceste afirmatii se bazeaza pe ideea ca orice factor supresor al sistemului imunitar poate sa determine o incidenta crescuta a cancerului, iar cei care il stimuleaza, cum ar fi infectiile bacteriene, pot reduce incidenta cancerului si pot reprezenta in acelasi timp si modalitati terapeutice ale acestuia. Exista date, chiar daca nu suficient argumentate, care incearca stabilirea unei corelatii intre incidenta cancerului si cea a bolilor infectioase, ca si cu utilizarea antibioticelor si a antipireticelor. Agentii infectiosi stimuleaza sinteza de γ - interferon, cu efect antitumoral, de catre limfocitele T activate si de factor pirogen endogen- de catre macrofagele activate, care determina reactia de febra, considerata a avea efect pozitiv, atât in apararea antiinfectioasa, cât si in cea antitumorala.

Microbiota normala a tractului respirator

La om, epiteliul cailor respiratorii are o suprafata mare, de aprox. 70 mp, expusa zilnic volumului de aer inspirat, care variaza intre 10.000 – 20.000 l, aer care este mai mult sau mai putin incarcat cu microorganisme. Tractul respirator superior (nazofaringe, orofaringe) este colonizat cu numeroase specii apartinând genurilor : *Staphylococcus* (inclusiv *S. aureus)*, *Streptococcus* (inclusiv *S. pneumoniae*), *Branhamella (*denumire actuala *Moraxella sp.,* de ex. *M. catharralis), Neisseria, Haemophilus, Corynebacterium, Lactobacillus, Candida.* Microorganismele se gasesc in secretiile mucoase locale (produse de glandele acinoase submucoase), patrunse odata cu aerul inspirat, fiind oprite la nivelul epiteliului nazal datorita secretiei nazale aderente si perilor ce tapeteaza cavitatile nazale inferioare. In multe situatii trec de aceasta bariera a etajului nazal, strabat laringele si ajung in trahee, unde sunt oprite de secretiile mucoase care se deplaseaza ascendent datorita activitatii cililor celulelor epiteliale (200 cili / celula), spre orofaringe, fiind apoi inghitite. Un numar mic de bacterii patrund in arborele traheobronsic, sub forma de picaturi cu diametrul de ~ 10 μm si imediat bacteriile sunt fagocitate de catre macrofagele pulmonare si alveolare, astfel ca plamânul este practic un organ steril. Aerul

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

expirat (la iepure) mai contine 0,4 din microorganismele inspirate. Exista si microorganisme rezistente la fagocitoza : *Mycobacterium tuberculosis* (rezista la digestia intracelulara) si *Streptococcus pneumoniae* (stratul capsular gros se opune fazelor de aderenta si ingestie consecutiva ale procesului de fagocitoza). La punctele de bifurcare ale arborelui traheobronsic mai ales, se gasesc foliculi limfoizi solitari, ca si limfocite intraepiteliale (cu fenotip de limfocite Th si Ts/c), componente ale sistemului BALT (***Bronchus associated limphoid tissue***) de aparare a mucoasei respiratorii. Acumularea mucusului in caile aeriene mai largi, ca si iritarea mecanica sau chimica a acestora, declanseaza reflexul de tuse si eliminarea acestei secretii incarcate cu microorganisme.

Microbiota normala a tractului genito-urinar

La femeie uretra este sterila, in timp ce la barbat treimea inferioara a acesteia este contaminata cu specii ale genurilor *Staphylococcus, Streptococcus, Lactobacillus* (prezenti si in vagin*), Corynebacterium, Neisseria, Candida albicans, Trichomonas vaginalis,* bacterii anaerobe si bacterii Gram negative neidentificate. In tractul genito –urinar feminin, lactobacilii (numiti si bacili Döderlein) fermenteaza glicogenul eliminat de celulele epiteliale, cu formare de acid lactic, care determina scaderea locala a pH-ului, cu rol protector. Acest mecanism lipseste pâna la pubertate si dispare dupa menopauza, lactobacilii fiind inlocuiti de alti germeni (stafilococi, streptococi, colibacili).

Relatiile dintre microorganisme si macroorganism (organismul gazda)

Principalele tipuri de relatii dintre microorganisme si macroorganism sunt: comensalismul, simbioza, oportunismul si parazitismul.

Comensalismul – din punct de vedere etimologic termenul deriva din cuvintele grecesti *co mensa* = la aceeasi masa. Aceasta relatie mai este denumita si metabioza si pe baza efectului direct pe care il are o specie asupra speciei asociate este notata (+/ 0)). Microorganismele traiesc si se hranesc in stransa relatie cu gazda, dar nu pe seama tesuturilor ei si nu determina modificari vizibile asupra gazdei. Exemple: microorganismele tegumentare.

Simbioza – este o relatie cu caracter beneficial bidirectional, notata pe baza efectului direct (++). Exemplul cel mai sugestiv este oferit de microbiota intestinului gros; aceasta secreta substante importante pentru organismul-gazda (dar nu esentiale), in timp ce acesta le ofera substante nutritive si protectie fata de conditiile de mediu. Aceste microorganisme pot fi considerate in esenta parazite, dar ale carui raporturi cu gazda au evoluat spre o toleranta mutuala completa si o infectie tolerata. Raporturile echilibrate care caracterizeaza starea de *eubioza* se pot deregla, evoluand spre starea de *disbioza*, ceea ce demonstreaza ca "simbiontii nu sunt altruisti".

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Oportunismul – este un tip de relatie cu o denumire antropomorfa, engl. o*portunity* insemnand prilej favorabil. Se poate prezenta in mai multe forme:

1) O forma mai putin cunoscuta este aceea in care un organism normal este purtator al unor bacterii patogene; este cazul purtatorilor « sanatosi » de germeni (expresie considerata in prezent depasita). Starea de purtator poate fi precedata sau nu de o boala:

- daca este precedata de o boala, aceasta este urmata de vindecare clinica, dar nu si de o sterilizare a focarului de infectie (vindecare bacteriologica);
- daca aceasta stare nu a fost precedata de boala, poate fi consecinta unei infectii inaparente (infectie asimptomatica, nemanifesta).

Astfel de situatii se intâlnesc, de exemplu, cand bacteriile contamineaza regiuni avasculare unde celulele si moleculele sistemului imunitar nu au acces; exemplul cel mai banal este cel al indivizilor care poarta in gât stafilococi, streptococi, meningococi, acestia putându-se transmite cu usurinta de la un individ la altul, mai ales in mediile aglomerate, pe cale aerogena, prin picaturile de saliva formate in cursul actelor de vorbit, tuse, stranut. De pilda, streptococii aflati in criptele amigdaliene pot determina periodic roseata, durere si febra sau asa-numita angina streptococica, mai ales in sezonul friguros. Un alt exemplu este cel al speciilor patogene de *Salmonella*; celulele bacteriene pot persista in organism intr-o stare de latenta timp de 10-20 de ani, apoi sa determine o recadere, o reaparitie a bolii in absenta unei noi infectii de la exterior.

2) O alta forma de oportunism este cea in care un organism se afla temporar intr-o stare de anormalitate, de exemplu dupa raniri grave, mari interventii chirurgicale, leziuni severe ale tegumentelor si mucoaselor (arsuri), ca si dupa tratamente prelungite cu antibiotice de spectru larg administrate pe cale orala, care distrug bacteriile sensibile si creeza o stare de disbioza , datorita anularii antagonismului existent in mod normal intre diferitele specii de microorganisme din microbiota normala, care se gasesc in stare de eubioza, de echilibru interspecific. Adesea, astfel de infectii oportuniste sunt produse de levuri (*Candida sp.*), care se multiplica necontrolat, fiind insensibile la antibiotice antibacteriene.

3) Organismul se poate afla, de asemenea, intr-o stare de anormalitate, reprezentata de deficitul imunitar , prezent in urmatoarele situatii:

a) – boli genetice si deficit imunitar innascut care afecteaza imunitatea mediata celular, imunitatea mediata umoral sau ambele tipuri de raspuns imun;

b) – dupa administrarea de medicamente imunosupresoare (utilizate, de exemplu, in tratamentul bolilor autoimune sau pentru prevenirea respingerii grefelor de tesuturi si organe) sau radioterapie, care are ca efect secundar distrugerea unui mare numar de limfocite;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

c) – in malnutritie;

d) – dobândit prin boala, prototip al acestui fel de deficit imun fiind boala SIDA (fr.) = AIDS (engl.) = sindromul de imunodeficienta dobandita ca urmare a infectarii organismului cu virusul HIV (*human immunodeficiency virus*). Prabusirea sistemului imunitar este determinata de faptul ca virusul are tropism si infecteaza limfocitele CD4+ = Th (helper), cosiderate pe buna dreptate "dirijorul orchestrei imunologice", datorita rolului lor deosebit de important in stimularea proliferarii si diferentierii celorlalte subpopulatii de limfocite, in desfasurarea raspunsului imun specific in toata amploarea sa. Recent s-a demonstrat ca virusul poate infecta si macrofagele, ca si celulele nervoase din sistemul nervos central (prin fuziune cu macrofagele infectate), ceea ce explica complicatiile neurologice ale acestei boli.

Consecinta relatiilor oportuniste este demonstrata tot de boala SIDA, care nu are semne caracteristice, patognomonice (ca scarlatina, difteria, pojarul etc). In general, infectiile oportuniste nu produc boli cu manifestari caracteristice, ci sindroame, cu manifestari diferite, decurgând din natura agentului agentului infectios oportunist si natura tesutului afectat (infectii intestinale, respiratorii, cutaneo-mucoase); de exemplu, când numarul total de leucocite scade sub 400/ mmc, bolnavii prezinta afte, inflamatii cu *Candida albicans,* micoze severe la nivelul membrelor inferioare ("picior de atlet"), *zona zoster* etc. Aparitia acestor infectii corespunde stadiului bolii cunoscut ca stare pre-SIDA sau ARC (*AIDS related complex).* Când numarul leucocitelor scade la 200/mmc, se produc infectii severe bacteriene (*Mycobacterium tuberculosis* si micobacterii paratuberculoase), fungice (*Cryptococcus neoformans*), *parazitare* (*Toxoplasma gondii, Cryptosporidium sp, Pneumocystis carinii* – aceasta ultima specie fiind incadrata in prezent intre microfungi) si virale (*Herpes simplex I* si *II, Herpes zoster, Cytomegalovirus).* Creste de asemenea frecventa aparitiei tumorilor (sarcomul Kaposi), cand numarul de leucocite scade la ~100/mmc.

Oportunistii nu sunt identici cu microorganismele saprotrofe (cum ar fi *Clostridium butulinum*) care traiesc pe materiile organice in descompunere si nu pot competitiona cu microbiota organismului normal, dar oportunisti se pot gasi printre saprotrofi (de ex. *Nocardia sp.).* Oportunistii nu sunt identici nici cu microbiota normala, chiar daca unii dintre membrii acesteia sunt capabili sa produca infectii oportuniste.

Pentru precizarea conceptului de microorganism oportunist, s-au stabilit urmatoarele conditii:

1) Microorganismul trebuie sa fie izolat de mai multe ori, din leziunile semnificative clinic, la gazde compromise din punct de vedere imunologic;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

2) Microorganismul trebuie sa fie semnificativ mai frecvent prezent si izolat in circumstantele respective decât in restul populatiei;
3) Asocierea nu trebuie sa fie determinata de o circumstanta care afecteaza atât sensibilitatea gazdei, cât si pe cea a microorganismului.
4) Asocierea nu trebuie sa fie indirecta, conjuncturala; de exemplu, s-a demonstrat ca salmonelozele sunt mai frecvente si mai severe la gastrectomizati, decât la indivizii martori de aceeasi vârsta si acelasi sex; relatia nu este specifica celor doua stari (gastrectomie si infectie), ci este determinata de hipoclorhidria consecutiva interventiei chirurgicale, care scade efectul bactericid al sucului gastric.

Lista bacteriilor implicate in infectii oportuniste este foarte lunga si incompleta, de multe ori fiind ignorate si considerate contaminanti intâmplatori, astfel ca nu apar pe buletinele de analiza. Dintre acestea pot fi enumerate:

- *Escherichia coli;*
- *Salmonella sp.;*
- *Enterobacter cloacae, E. aerogenes, E. agglomerans;*
- *Edwardsiella;*
- *Erwinia herbicola;*
- *Klebsiella pneumoniae;*
- *Proteus mirabilis;*
- *Yersinia enterocolitica, Y. pseudotuberculosis;*
- *Haemophilus influenzae, H. parainfluenzae;*
- *Lactobacillus casei, L rhamnosus, L plantarum;*
- *Listeria monocytogenes;*
- *Mycobacterium tuberculosis, M. kansasii, M. avium, M. fortuitum;*
- *Moraxella catharralis, M. lacunata;*
- *Mycoplasma pneumoniae;*
- *Neisseria meningitidis;*
- *Nocardia sp.;*
- *Dermatophilus congolensis;*
- *Pseudomonas aeruginosa, P. cepacia;*
- *Staphylococcus aureus, S. epidermidis;*
- *Streptococcus pyogenes, S. pneumoniae, S. agalactiae;*
- *Acinetobacter calcoaceticus (Herellea vaginicola);*
- *Alcaligenes sp;*
- *Bacillus cereus, B. licheniformis;*
- *Bacteroides fragilis;*
- *Clostridium perfringens, C. septicum, C. difficile, C. tertium;*
- *Corynebacterium pseudodiphtericum.*

Parazitismul - corespunde relatiei in care un organism se hraneste cu celulele, tesuturile sau lichidele corpului altui organism viu, care poate suferi prejudicii, mai mult sau mai putin severe. Relatia parazit-gazda este, in general, de relativ lunga durata deoarece, asa cum sustinea Burnet (distins cu premiul Nobel pentru Fiziologie si medicina in 1960), parazitii cei mai bine adaptati sunt cei care nu isi distrug gazda , deoarece aceasta ar insemna si disparitia lor.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Parazitismul celor aprox. 550 de bacterii cunoscute ca patogene pentru om si animale se poate manifesta in grade diferite:

- **extracelular** – ex.: *Staphylococcus sp., Streptococcus sp., Bordettela pertussis, Vibrio cholerae, Neisseria sp., Mycoplasma sp. etc.*;
- **facultativ intracelular** – ex.: *Mycobacterium tuberculosis, Salmonella typhi, Listeria monocytogenes, Brucella sp.*;
- **obligat intracelular** – caracterizeaza bacteriile incadrate in familiile: *Rickettsiaceae, Chlamydiaceae, Bartonellaceae*; aceste bacterii nu pot fi cultivate pe medii bacteriologice, ci numai pe un substrat celular.

In unele cazuri relatia parazit-gazda se manifesta cu mare specificitate, cum este cazul bacteriei *Mycobacterium leprae*, care infecteaza natural numai specia umana. Specificitatea este conditionata de faza initiala de recunoastere si aderare a microorganismelor patogene la nivelul unor receptori specifici de pe membrana celulelor-gazda sensibile.

Bacteriile parazite intracelular au dezvoltat in cursul evolutiei proprietati care le permit sa se dezvolte in acest mediu; unele sunt capabile sa supravietuiasca chiar in interiorul macrofagelor, un mediu cunoscut ca impropriu, prin mecanisme care se opun procesului de digestie intracelulara; de exemplu bacteriile apartinând speciei *Mycobacterium tuberculosis*, au un perete celular cu o structura particulara, cu un continut bogat in lipide - ceruri (acizi micolici esterificati cu trehaloza), componente care le protejeaza de activitatea enzimelor lizozomale.

Daca microorganismele parazite sunt si patogene, corelatia inversa nu este obligatorie, astfel ca exista si bacterii saprotrofe (ex. *Clostridium botulinum*), incapabile sa se multiplice in organism, dar care pot fi patogene, datorita exotoxinelor produse si eliberate in mediu, eventual ingerate de catre gazda.

Microorganismele patogene si proprietatile lor definitorii. Microorganismele patogene au doua proprietati care le definesc : 1) p*atogenitatea* si 2) *virulenta.*

1) Patogenitatea este o proprietate esentiala a oricarui agent infectios si se refera la capacitatea acestuia de a determina aparitia unui proces infectios (persistenta+/- multiplicarea in organismul gazdei), de obicei decelabil din punct de vedere clinic (starea de boala), atunci când patrunde in mod natural sau când este introdus experimental in organismul unei gazde sensibile.

Procesul infectios sau infectia (lat. *inficere* = a otavi, a deteriora) este determinata de capacitatea agentului patogen de a se localiza si multiplica in organism, asigurând stabilirea in gazda prin colonizarea tranzitorie sau de durata, ca si transmiterea la o noua gazda sensibila. Infectia poate fi inaparenta sau manifesta, in acest caz având o evolutie asociata cu perturbarea

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

starii normale de sanatate a organismului-gazda si cu fenomene de disconfort, boala infectioasa având de multe ori un tablou clinic caracteristic.

Patogenitatea este o proprietate de specie, care a aparut in cursul coevolutiei agentilor patogeni cu organismele-gazda si consta in insusirea potentiala a unui agent infectios de a infecta si de a produce imbolnavirea organismelor receptive, sensibile. Ca urmare, unele bacterii sunt patogene, cu grade de virulenta diferite de la o tulpina la alta (*Bacillus anthracis, Corynebacterium diphteriae, Clostridium tetani*), in timp ce altele sunt intotdeauna nepatogene datorita incapacitatii lor de a se stabili si de a se multiplica intr-un organism animal (*Azotobacter sp., Nitrobacter sp., Rhizobium sp.*).

Patogenitatea se caracterizeaza prin patru proprietati esentiale:

1) capacitatea de a patrunde si a se localiza in organismul-gazdei;
2) multiplicarea in tesuturile acesteia (si eventual producerea de toxine) si/sau invadarea acestora;
3) capacitatea de a stimula un raspuns imun si de a rezista mecanismelor de aparare ale gazdei;
4) producerea de leziuni, manifestate prin simptome de boala.

Adaptarea unui microorganism patogen pentru om, animale sau plante nu implica un grad foarte inalt de patogenitate, tocmai pentru ca tulpinile patogene care determina o mortalitate mare printre organismele infectate, supravietuiesc mai greu in natura, prin urmare si diseminarea lor in natura va fi limitata sau poate inceta complet. In consecinta, agentii patogeni cel mai bine adaptati pentru a supravietui sunt cei care provoaca infectii usoare, cu un numar mare de imbolnaviri subclinice si cei care determina o imunitate slaba si de scurta durata.

2) Virulenta reprezinta capacitatea unei tulpini date a unui microorganism patogen, aflata intr-o anumita faza de crestere, de a se localiza, de a coloniza, de a se multiplica si, eventual, de a invada celulele si tesuturile organismului-gazda si de a produce toxine, determinând o stare patologica la o anumita gazda, atunci când este introdusa in organismul acesteia in conditii bine definite. Aceasta definitie constituie o viziune ecologica a relatiei obligatorii dintre parazit si gazda in determinarea bolii, ca si a gradului sau de gravitate, dependent de particularitatile celor doi parteneri la momentul stabilirii relatiei.

Virulenta este o proprietate multifactoriala, care exprima cantitativ gradul de patogenitate al unei tulpini pentru o anumita gazda si este determinata de insumarea unor insusiri diferite si independente, cum sunt capacitatea de infectiozitate, de invazie si de toxigenitate. Datorita acestor insusiri, agentul patogen poate sa reziste mecanismelor de aparare ale gazdei, nespecifice- care incep sa actioneze imediat dupa patrunderea acestuia in organism si apoi celor specifice, mai

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

eficiente; daca agentul patogen este capabil sa reziste si sa se adapteze, sa se multiplice, va determina starea de boala.

Virulenta este o proprietate de tulpina, ce variaza de la o tulpina la alta in cadrul aceleiasi specii, dar si la aceeasi tulpina, deoarece in timp se pot castiga sau pierde factori de virulenta, prin mutatii sau retromutatii, ca si prin câstig sau pierdere de plasmide. Mai mult, virulenta poate fi influentata si de diferitele proprietati ale organismului-gazda, ale terenului fata de care se manifesta virulenta.

Virulenta poate fi cuantificata experimental; initial, se aprecia in functie de cantitatile minime de bacterii sau de toxina capabile sa produca moartea animalelor la care erau administrate si se exprima prin doza minima letala (DML), care reprezinta cantitatea minima de bacterii (sau de toxine) care produce infectia (respectiv intoxicatia) si moartea tuturor animalelor receptive, raportata la o anumita specie animala, cu o greutate standard si la o anumita perioada de timp. Pentru a evita erorile legate de variatiile individulale ale organismelor-gazda, determinarile se fac pe loturi mari de animale (de regula 10) si se exprima prin DL50 (doza letala), care reprezinta cantitatea minima de microorganisme (sau de toxina) care determina moartea a 50% dintre animalele inoculate.

Virulenta este determinata de mai multi factori de virulenta cum sunt: infectiozitatea, agresivitatea, capacitatea de aderenta la un substrat celular sensibil, toxigenexa.

Factori de virulenta

Infectiozitatea consta in capacitatea agentilor patogeni de a stabili un focar infectios primar, ocupând un anumit teritoriu in organismul-gazda.

Agresivitatea sau ***invazivitatea*** rezida in capacitatea microorganismelor patogene de a coloniza, de a se localiza in organismul gazdei, de a se multiplica si de a difuza sau a invada organismul gazda pe diferite cai (cale vasculara, nervoasa, prin tesutul conjunctiv). Agresivitatea nu este o proprietate obligatorie la bacteriile patogene, deoarece exista bacterii neagresive care determina imbolnaviri grave, cu efect letal. Unele pot provoca un focar infectios local si ramân cantonate la acel nivel, asa cum este cazul bacteriei *Corynebacterium diphteriae*, agentul patogen al difteriei, care se localizeaza la nivelul orofaringelui si elimina o toxina foarte puternica care ajunge in fluxul sanguin si difuzeaza in tot organismul. *Streptococcus pneumoniae* nu produce toxine, dar are o mare capacitate de invazie in tesutul pulmonar datorita multiplicarii intense, urmate de modificari structurale si functionale ale acestuia ce conduc la *exitus*.

Aceasta proprietate este determinata de capacitatea agentului patogen de a sintetiza si a elibera o serie de factori de difuziune numiti *agresine*, care sunt lipsite de toxicitate, dar creeaza

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

conditii ce asigura raspândirea bacteriilor, favorizând in acelasi timp si multiplicarea lor. Bacteriile foarte agresive determina infectii grave, mortale; un exemplu in acest sens poate fi bacteria *Bacillus anthracis,* agentul patogen al antraxului, care are un efect letal prin capacitatea mare de multiplicare si formarea de trombusuri ce astupa capilarele, determinând fenomene de hipoxie, ischemie si necroza tisulara, dar si prin producerea de toxine.

Agresinele favorizeaza colonizarea gazdei de catre agentul patogen, reprezentând prima etapa, *sine qua non*, a oricarui proces infectios, prin urmatoarele mecanisme: faciliteaza difuzia agentului patogen in tesuturile gazdei, interfera cu mecanismele de aparare ale gazdei, reducându-le eficienta, potenteaza infectiozitatea agentilor patogeni. Exemple :

Factori de difuziune: enzime bacteriene *-hialuronidaza* – depolimerizeaza hialuronatul din tesutul conjunctiv, pe care îl fluidifica, facilitind diseminarea agentului patogen in organism;

Agresine care interfera cu factorii celulari si umorali bactericizi nespecifici ai gazdei (fagocitele, lizozimul, complememtul).Aceste efecte sunt atribuite polizaharidelor capsulare si unor componente ale peretelui celular ; exemple :

- unele bacterii sintetizeaza molecule cu efect chimiotactic negativ asupra fagocitelor (*S. aureus, M. tuberculosis*) ;
- *Brucella sp.* produce leucopenie marcata, prin efect direct asupra maduvei hematogene ;
- materialul capsular din structura celulelor de *S. pneumoniae, Haemophilus influenzae, Klebsiella pneumoniae* inhiba aderenta celulelor bacteriene la membrana fagocitelor PMN, prin proprietatile lor hidrofile si datorita fortelor electrostatice de respingere, care se manifesta in cazul cand bacteriile nu sunt opsonizate de catre complement si anticorpi (C3b, IgG), a caror legare are ca efect cresterea hidrofobicitatii bacteriilor ;

Enzime care favorizeaza invazia - prin alterarea integritatii tisulare, prin citoliza locala sau la distanta a unor celule sensibile (leucocite, hematii), prin activarea mecanismelor fibrinolitice, cum ar fi :

- *colagenaza* – enzima degradativa a colagenului, produsa de *Clostridium histolyticum* , cu efect de dezintegrare a tesutului muscular ;
- lecitinaza (fosfolipaza C) produsa de *Clostridium perfringens, S. aureus, Pseudomonas sp.* – scindeaza lecitina (component al membranei celulare) in fosforilcolina si diglicerid, având un efect citolitic (asupra diferitelor tesuturi, hematiilor, leucocitelor) si de rupere a membranei organitelor celulare (mitocondrii, reticul endoplasmic) ;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- coagulazele au un efect de coagulare a fibrinogenului ;
- fibrinolizinele (streptokinaza, stafilokinaza) produc liza cheagului sanguin care se formeaza ca reactie de aparare locala, favorizând diseminarea bacteriilor din reteaua de fibrina ;
- toxine enzime cu actiune selectiva asupra anumitor celule ale gazdei : hemolizine si leucocidine ;
- enzime cu actiune degradativa asupra moleculelor de ADN : streptodornaza ;

Factori care interfera cu raspunsul imun – microorganismele patogene pot supravietui in organismul-gazda prin mecanisme care reduc eficienta raspunsului imun sau chiar il anuleaza ; exemple :

- antigene heterofile – asemanarea chimica a anumitor componente bacteriene (Ag) cu componente ale gazdei, cum ar fi : proteina M a streptococilor care este asemanatoare din punct de vedere chimic cu constituenti ai fibrei miocardice ; LPS din structura peretelui celular al bacteriilor Gram negative, care se aseamana chimic cu antigenele de histocompatibilitate; capsula bacteriei *Streptococcus pyogenes* contine acid hialuronic, care intra si in compozitia tesutului conjunctiv, astfel ca materialul capsular nu este antigenic ;
- determinantii antigenici bacterieni pot fi mascati de molecule protectoare ale gazdei : de exemplu, coagulaza stafilococica asigura izolarea celulelor bacteriene intr-un strat de fibrina ;
- *Treponema pallidum* produce un material polizaharidic extern care absoarbe proteine serice care protejeaza bacteriile impotriva efectorilor imunitari al gazdei ;
- bacteriile pot sintetiza componente chimice care diminueaza intensitatea raspunsului imun ; astfel, celulele de *Klebsiella pneumoniae* elibereaza antigene solubile de suprafata (polizaharide capsulare) care interactioneaza cu anticorpii circulanti, reducând eficienta raspunsului imun ;
- bacteriile patogene care colonizeaza mucoasele, au in general proprietatea de a elabora enzime extracelulare, cu ajutorul carora contracareaza efectul protector al anticorpilor sIgA ; aceste enzime (sintetizate de *Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Neisseria meningitidis, N. gonorrhoeae*) sunt din categoria proteazelor si cliveaza IgA_1, in fragmentele Fab si Fc ; moleculele subclasei IgA_2 sunt rezistente la proteoliza, deoarece le lipseste o secventa de 16 aminoacizi situata langa regiunea balama, care confera sensibilitate la proteoliza enzimatica ; cu exceptia bacteriei *N.*

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

gonorrhoeae, sinteza IgA proteazelor este asociata la bacteriile respective cu prezenta capsulei, care are efect antifagocitar ; in replica, organismul gazda produce anticorpi anti-IgA proteaze (din clasele IgA si IgG) ;

- LPS (endotoxinele bacteriilor Gram negative) – componenta polizaharidica sau Ag somatic « O », fiind situata la distanta de membrana externa a peretelui celular, impiedica liza acesteia mediata de complement, desi anticorpii specifici se leaga de determinantii antigenici bacterieni ;
- proteinele membranei externe nu au numai rol structural, ci indeplinesc si alte functii ; rolul lor in virulenta se realizeaza in principal pe trei cai : 1) participarea la procesul de incorporare a fierului ; 2) mediatori de aderenta la celulele sensibile ; 3) mediatori de invazie ; proteinele care exercita aceste functii nu actioneaza separat, ci uneori aceeasi proteina poate avea mai multe functii ;
- peptidoglicanul (mureina), constituentul major al peretelui celular la bacteriile Gram pozitive (80 – 90 % din greutatea uscata a peretelui), prezent in cantitate mult mai mica la cele Gram negative (2 – 10 % din greutatea uscata a peretelui), are nu numai rol structural, ci este implicat si in patologie ; s-a demonstrat ca fragmente mici de perete celular (g.m. 5,3 x 10^6 Da) determina artrite acute, in timp ce fragmentele mari determina artrite cronice cu debut tardiv. Pe lânga acest efect artritogen, s-au demonstrat si alte efecte ale peptidoglicanului : pirogen, somnogen, mitogen, de inducere a sintezei de interleukina –1, interferoni si prostaglandine, de stimulare a fagocitozei ;
- lipoproteinele si acizii teichoici activeaza sistemul complement, au efect mitogen, imunogen, de activare a functiei macrofagelor.

Rolul cationilor Fe^{3+} in virulenta

Multiplicarea eficienta a bacteriilor patogene in tesuturile organismului gazda este conditionata de prezenta obligatorie a fierului feric, intr-o forma accesibila metabolismului lor, fierul fiind necesar pentru anumite reactii enzimatice esentiale pentru crestere, ca si un component cheie al catenei de transport al electronilor in membrana celulara (de respiratie celulara); fierul intra si in compozitia superoxiddismutazelor la bacteriile Gram negative aerobe si facultativ aerobe (enzime necesare in respiratia aeroba, ca mecanism de aparare fata de sistemele microbicide dependente de oxigen si mieloperoxidaza ale fagocitelor) ; desi fierul este prezent in mediul natural, ca si in organismul mamiferelor, in concentratii suficiente pentru a asigura cresterea nelimitata a microorganismelor, se gaseste in forma inaccesibila ; un deficit minor are

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

efecte bacteriostatice, in timp ce un deficit major are efecte bactericide (este inhibata proteosinteza).

Producerea multor metaboliti extracelulari, inclusiv toxine, este partial reglata de concentratia ionilor de Fe in mediul inconjurator. De exemplu, expresia genei structurale a fagului β pentru toxina difterica din tulpinile lizogene de *Corynebacterium diphteriae,* este dependenta de nivelul de Fe.

Mecanismele insolubilizarii fierului in organismul animal. Fierul anorganic este insolubil in aerobioza si la pH in limite fiziologice ; in mediul natural fierul este legat de agenti chelatori sau complexoni (in structura ciclica), pe când in organismul mamiferelor este legat in complexe organice cu proteine chelatoare, astfel ca bacteriile invadatoare trebuie sa competitioneze pentru fier cu unii constituenti celulari ca : feritina, hemosiderina, gruparea hem si unele glicoproteine extracelulare, precum si cu trasferina (TF) din sânge si limfa. Aceste substante au afinitate pentru fier si sunt partial saturate (TF este saturata in proportie de 30% din capacitatea sa de legare) si determina reducerea concentratiei fierului liber in organism la valori foarte mici – la concentratia de 6 x 10^{-9} μM serul sanguin fiind bacteriostatic.

Mecanisme de obtinere a Fe pentru crestere. S-a demonstrat ca *E. coli* sintetizeaza mai multe sisteme biochimice care asigura translocarea fierului feric in celule, apoi acesta este convertit in Fe feros (utilizat in celula bacteriana). Un mecanism majoritar îl constituie sinteza si secretia unor agenti chelatori numiti *siderofori*, cu mare afinitate pentru fierul feric ; sinteza acestora este indusa de scaderea concentratiei fierului sub un prag critic (10 μM).

Un microorganism poate sintetiza 1 - 2 siderofori, care sunt prezenti la speciile patogene, cât si la cele comensale si saprotrofe. De exemplu, *E. coli* si alte enterobacterii care sunt componente ale microbiotei normale intestinale (*Klebsiella sp., Enterobacter sp.*) produc siderofori denumiti generic *enterocheline (-bactine*). La *E. coli* constituie un factor esential de virulenta, prezent la tulpinile enteropatogene si enteroinvazive, ca si la cele izolate din infectiile extraintestinale (septicemii, meningita neonatala, infectii urinare = pielonefrite la om si animale). Dar siderofori au fost identificati si la enterobacterii patogene, cum ar fi : *Shigella sp., Salmonella sp., Yersinia sp.* Siderofórii pot fi denumiti si dupa specia producatoare; de ex : *Aerobacter aerogenes* sintetizeaza aerobactina; specii ale genului *Neisseria* - gonococii produc *gonobactine;* meningococii produc *meningobactine;* speciile genului *Pseudomonas* produc *piocheline.*

Exista receptori pentru siderofori (asemanatori cu cei pentru bacteriofagi, toxine), ceea ce constituie o dovada in plus a importantei fierului in biologia bacteriilor.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Capacitatea de aderenta a bacteriilor la substrat

Notiunea de **aderenta** in biologie constituie un concept de o importanta fundamentala, mecanismele de fixare fiind o etapa prealabila necesara majoritatii proceselor biologice, atât fiziologice cât si patologice. Organizarea arhitecturala complexa ca si potentialul functional major al invelisurilor celulare, care interfera cu toate procesele biologice care se desfasoara la nivel celular, au determinat ca structurile de granita sa devina de multa vreme un subiect privilegiat al biologiei celulare si moleculare, inclusiv al imunologiei.

Dupa lucrarile de pionierat de la inceputul secolului al XX-lea asupra adeziunii microbiene, referitoare la mediul marin unde suprafetele constituie adesea singurele situsuri in care concentratiile de nutrienti sunt adecvate cresterii microbiene, s-a conturat apoi ideea ca adeziunea este si un important factor determinant al colonizarii unor situsuri specifice la plante si animale si in special, **o etapa timpurie cruciala in procesul infectios**, fiind o preconditie a colonizarii organismelor parazitate. Justificat de importanta medicala a fenomenului in patogeneza bolilor infectioase, aderenta a fost mult studiata la bacteriile patogene, la care este considerata un factor de virulenta (dupa unii autori un factor aparte, dupa altii, unul dintre factorii de agresivitate). Mai mult, infectiile in care agentii cauzali cresc in biofilme sunt profund diferite de infectiile cauzate de bacterii libere, datorita etologiei lor, timpului de generatie diferit, sensibilitatii diferite la agenti antimicrobieni. Adeziunea bacteriana este implicata nu doar in interactiunile dintre microorganisme si macroorganisme, ci si in cele dintre microorganisme si dintre acestea si substraturi inerte din punct de vedere nutritional, cum sunt cele utilizate in medicina ca dispozitive protetice (diferite tipuri de sonde, catetere, proteze s.a.).

Etapele procesului de aderenta bacteriana. Zo Bell si Allen in, ulterior Marshall si colab. (1971) au distins doua faze in atasarea bacteriilor la suprafete. Prima faza este reversibila si consta intr-o asociere slaba in care bacteriile sunt mentinute in vecinatatea suprafetei prin forte slabe London - van der Waals. A doua faza - ireversibila, este dependenta de timp si implica sinteza de catre bacterii a unor fibrile extracelulare polimerice pentru a lega cele doua suprafete si astfel, a invinge forta repulsiei electrostatice dintre cele doua suprafete incarcate electronegativ. Aderenta implica apropierea strânsa dintre cele doua tipuri de celule, care permite interactiunea situsurilor complementare de pe suprafata lor. Desi cele mai multe bacterii sunt incarcate electronegativ, ele poseda regiuni limitate ale suprafetei, electropozitive, ca si molecule cu caracter hidrofob (hidrofobine). Prezenta gruparilor cu sarcini opuse si a hidrofobinelor face posibila totusi apropierea si interactiunea foarte stabila intre doua suprafete foarte electronegative (fig. 2).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

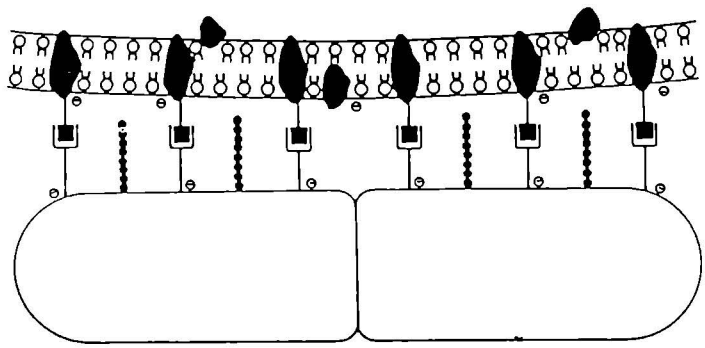


Fig. 2. Atasarea celulelor bacteriene prin intermediul adezinelor specifice (⊔) la receptori complementari (∩) de pe membrana celulei-gazda. Invingerea repulsiei electrostatice dintre suprafetele celor doua celule incarcate negativ este posibila prin atragerea moleculelor hidrofobe (♦) de pe suprafata bacteriilor, de catre molecule hidrofobe ale fosfolipidelor membranare (Ω).

Mecanismul de atasare corespunzator fazei reversibile este cunoscut ca o **aderenta nespecifica** si este forma obisnuita de adeziune observata in cazul acelor microorganisme capabile sa adere la diferite tipuri de suprafete inerte (neanimate). Mecanismul **aderentei specifice** (care corespunde fazei ireversibile) a anumitor microorganisme la anumite suprafete, implica si interactiuni intre molecule complementare de pe suprafata microorganismelor si suprafetele de atasare. Adeziunea bacteriilor la celulele animale se realizeaza prin acest mecanism. Bacteriile poseda pe suprafata lor molecule de legare numite *adezine* care sunt capabile sa interactioneze stereospecific cu *receptorii* de pe membranele celulelor gazda, intr-o maniera analoga interactiunilor antigen - anticorp sau lectine vegetale - glucide. Astfel, un proces initial de retinere laxa este urmat de o ancorare permanenta, care necesita formarea de multe legaturi lacat-cheie intre aceste molecule complementare. Când aceasta este realizata, atasarea este virtual ireversibila in conditii fiziologice.

Etapa de legare ireversibila sau permanenta se realizeaza la distante foarte mici de peretele celular si numai când interactiunile de la distanta sunt dominate de fortele atractive (fig.3). Adeziunea este favorizata de prezenta polizaharidelor extracelulare si a glicoproteinelor preformate sau sintetizate *de novo* pe suprafata celulelor care adera, ca si de prezenta unor apendice filamentoase (fimbrii, pili, flageli) care interactioneaza cu receptorii complementari. Pentru sinteza *de novo* a adezinelor este necesara activitatea metabolica celulara, realizata cu consum de energie. Fenomenul explica de ce bacteriile in faza exponentiala de crestere adera mai repede de substraturi decât celulele din faza stationara, batrâne sau moarte.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Colonizarea suprafetelor. Dupa legarea ferma, bacteriile incep sa creasca si sa se inmulteasca rapid. Celulele legate ireversibil de substrat, dar nu si intre ele, formeaza un monostrat continuu care acopera toata suprafata substratului, iar cele legate si de substrat si intre ele formeaza *microcolonii* si *biofilme*. Ulterior, biofilmele devin pluristratificate si se adauga uneori, cantitati mari de polimeri specifici, cu structura reticulata sau fibrilara, care ancoreaza suplimentar biofilmul. Când acesta devine suficient de gros, straturile profunde devin anoxice si contin preponderent specii anaerobe. Treptat, celulele bazale sunt infometate si pot sa moara sau sa se lizeze. Aceste fenomene -anoxia, moartea celulelor, la care se adauga si producerea de gaze, pot destabiliza biofilmul, determinând detasarea unor agregate celulare de suprafetele solide si diseminarea lor la distanta. Cresterea poate fi reluata, având un caracter ciclic.

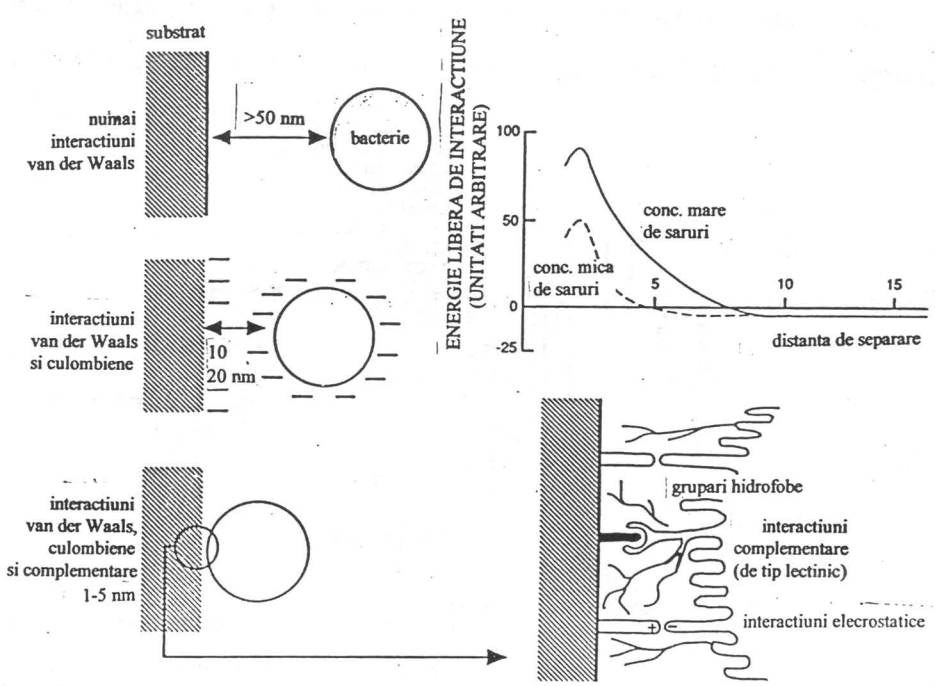


Fig. 3. Schema care ilustreaza cele doua suprafete incarcate electric care interactioneaza in procesul de aderenta bacteriana (substrat – celula bacteriana); interactiunile sunt in functie de distanta dintre cele doua suprafete, de concentratia de electroliti, ca si de prezenta unor situsuri de legare complementare.

Cercetarile au demonstrat ca bacteriile aderente prezinta o crestere mai intensa si o viteza metabolica mai mare, comparativ cu cea a populatiilor aflate in suspensie. Gruparea microorganismelor in microcolonii aderente stimuleaza schimburile respiratorii, iar prin prezenta exopolizaharidelor se asigura mentinerea unui pH apropiat de cel optim, ca si protectia fata de desicatie si substante antimicrobiene.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Adezinele bacteriene ca factor de virulenta si implicatiile imunologice ale caracterului lor antigenic

Capacitatea agentilor patogeni de a adera la suprafata celulelor sensibile este mediata de structuri de pe suprafata lor, denumite generic *adezine*. Termenii de *adezina si receptor* sunt utilizati pentru a descrie componente care mediaza atasarea microorganismelor la celulele animale. Adezinele sunt structuri adezive de pe suprafata celulelor microbiene, in timp ce receptorii sunt structuri adezive complementare prezente pe suprafata celulelor gazda. Pe calea unor activitati de tip lectinic, adezinele asigura aderenta si colonizarea diferitelor mucoase: respiratorii, intestinale, urogenitale si chiar a unor suprafete solide ca dentina.

Capacitatea bacteriilor de a adera impiedica indepartarea lor prin mecanisme fizice si fiziologice care constituie prima linie de aparare a organismului, cum ar fi: fluxul diferitelor secretii, tuse, mobilitatea foarte activa a cililor, peristaltism etc., asigurând colonizarea anumitor situsuri din organism, multiplicarea, sinteza toxinelor si evolutia unor reactii inflamatorii (fig. 4).

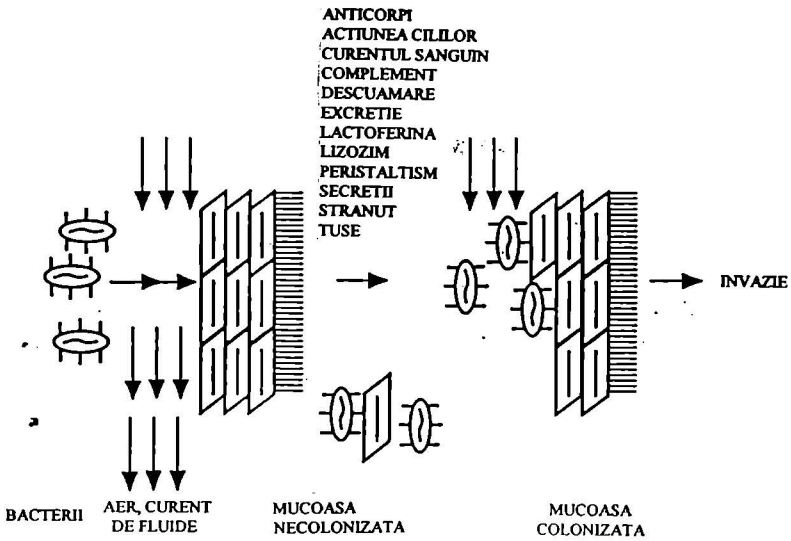


Fig. 4. Schema reprezentând efectele mecanismelor rezistentei naturale a organismului asupra aderentei bacteriilor la suprafetele mucoase, care constituie principala poarta de intrare a agentilor patogeni in organism. Pentru a adera, a prolifera si a coloniza un anumit situs, agentul patogen trebuie sa invinga numeroasele mecanisme de aparare active la nivelul suprafetelor (tegumente si mucoase).

Bacteriile adera in general de epiteliile mucoaselor, dar si de celule epiteliale cheratinizate, endotelii, oase, dinti etc. In unele cazuri, acest fenomen se manifesta cu un grad important de selectivitate, in altele este total nespecific. Pe lânga rolul esential in declansarea procesului infectios, aderenta reprezinta si un avantaj ecologic important pentru bacteriile patogene (posibilitatea de acces la nutrienti, temperatura favorabila, protectie fata de lizozim, fagocite, anticorpi etc.).

In ultimii ani a devenit evident ca aderenta câtorva celule bacteriene si formarea consecutiva de microcolonii reprezinta o etapa esentiala in evolutia anumitor infectii.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Evidentierea aderentei bacterie-bacterie (cu formarea de microcolonii de *E. coli* enteropatogene, *Vibrio cholerae* s.a.) a condus la speculatia ca bacteriile au si receptori asemanatori cu cei ai gazdei, ceea ce constituie un avantaj pentru bacterii ; de exemplu, se poate realiza o concentratie locala mare a unor enzime citolitice, care favorizeaza invadarea tesutului sensibil pe cale transcelulara sau printre celule, dupa ruperea jonctiunilor intercelulare.

Specificitatea interactiunii bacterii-celule sensibile poate explica natura celulelor infectate si chiar manifestarile bolii. Fenomenele de aderenta au fost studiate la un numar important de bacterii patogene, cum ar fi : *Streptococcus mutans, S. salivarius, S. pyogenes, S. pneumoniae, Klebsiella pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Salmonella sp., Vibrio cholerae, Proteus mirabilis, Pseudomonas aeruginosa, Haemophylus sp., Neisseria gonorrhoeae* etc. Capacitatea de aderenta la suprafata celulei gazda fiind o preconditie a proceselor de colonizare si invazie microbiana, ca si etapa initiala a unei infectii, microorganismele patogene, ca o consecinta a coevolutiei gazda - parazit, au dezvoltat o diversitate de structuri care mediaza aderenta la tesuturile gazda.

Au fost descrise si caracterizate mai multe tipuri de adezine, diferite ca arhitectura moleculara, specificitate de legare, proprietati serologice si determinism genetic. S-a demonstrat ca unele bacterii patogene au chiar mai multe tipuri de adezine.

Principalele tipuri de adezine si rolul lor in virulenta. Lista adezinelor este mare si cuprinde, pe lânga lectinele bacteriene si fimbrii, diferite structuri moleculare (acizii lipoteichoici, fibronectinele, proteinele de suprafata celulara, hidrofobinele, polianionii, polizaharidele extracelulare etc. (tabelul nr.1). Aceste adezine pot fi deci exprimate singure sau pot fi multiple pe aceeasi celula bacteriana si pot fi reglate de conditiile de mediu, inclusiv de cele oferite de gazda.

1. Fimbriile sunt apendice filamentoase tubulare, neflagelare, rigide, dispuse de obicei pericelular, de dimensiuni mici (10-200 nm), cu diametrul de 7 nm, dar aflate in numar foarte mare – intre 100-1000 / celula. Sunt codificate de gene cromosomale (un *cluster* de gene *fim*, de 9,5 kb ADN cu secvente structurale si reglatoare) si neimplicate in transferul de ADN viral, cromosomal sau plasmidial. Sunt alcatuite dintr-un numar variabil de subunitati moleculare de fimbrilina, o proteina cu o greutate moleculara de 16.600 Da, asamblate dupa o simetrie helicala.

In cazul bacteriilor patogene, fimbriile pot influenta virulenta acestora pe mai multe cai:

1. Prezenta lor favorizeaza implantarea bacteriilor in organism, prin fixarea acestora de celule si tesuturi, fixare necesara pentru colonizare si pentru a evita ''spalarea'' lor de catre

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

lichidele corpului, sau indepartarea prin acte fiziologice ca stranutul si tusea in cazul bacteriilor care colonizează caile respiratorii superioare.

2. In unele cazuri aceasta proprietate se manifesta cu specificitate de tesut; de exemplu, celule de *Escherichia coli* izolate din infectii urinare adera numai de epiteliul urinar.
3. Unele antigene din fimbrii induc formarea de anticorpi anti-fimbrii, iar altele maresc virulenta bacteriilor conferindu-le rezistenta marcata la fagocitoza.

Rolul fimbriilor in adeziune si virulenta. Anumite tulpini de *E. coli* sunt capabile sa produca infectii severe intestinale si extraintestinale. Tulpinile patogene de *E. coli* sunt capabile sa produca diferiti factori de virulenta cum ar fi factori de aderenta (fimbrii, capsule), toxine, siderofori. Adezinele acestor tulpini se deosebesc prin capacitatea de hemaglutinare, morfologie, antigenitate si specificitate de receptor.

Tabel nr. 1. Exemple de adezine si receptori care mediaza legarea unor bacterii patogene de suprafata mucoaselor.

Microorganismul	Adezina	Receptorul
Escherichia coli	Fimbrii tip - 1	D-manoza
	Fimbrii P	α-D-Galp-(1-4)-β-D Galp
	Fimbrii K 88	β-D-Gal sau Glc, Gal si Fuc (gangliozid Gm_1)
	Fimbrii K 99	⎫ Gal Nac β(1-4)Gal β(1-4)Glc
	Fimbrii CFA	⎭ (gangliozid GM_2) 2 Neu Ac
Pseudomonas aeruginosa	Fimbrii	Resturi de acid sialic
Vibrio cholerae	Fimbrii	Fucoza
Neisseria gonorrhoeae	Fimbrii	Gal β(1-3) Gal Nac β(1-4) Gal
Staphylococcus aureus	Acidul lipoteichoic	Fibronectine
Streptococcus pyogenes	Complexul acid lipoteichoic-proteina M (fibrile)	Fibronectine
Streptococcus mutans	Proteina de legare a glucanului	Glucan
Streptococcus salivarius	Lectina suprafetei celulare	Galactoza
Streptococcus sanguis	Acidul lipoteichoic	Resturi de acid sialic

Fimbriile tip-1 se ataseaza la receptori care contin manoza (hemaglutinaea bacteriilor cu fimbrii manozo-sensibile este inhibata in prezenta D-manozei) si determina aderenta celulelor de

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

E. coli la mucus, la celulele tractului gastrointestinal, urinar si ale orofarinxului), jucând un rol in colonizarea si diseminarea bacteriilor in corpul omului si animalelor. Una din bacteriile cel mai mult studiate este *E. coli* uropatogena pentru om, la care au fost descrise mai multe tipuri de fimbrii diferite pe baza morfologiei, a situsului specific de legare etc. (tabel nr. 2). Pe de alta parte, au fost localizati si receptorii de pe celulele mamiferelor (in rinichiul uman si vezica urinara) cu ajutorul marcarii diferentiale (cu izotiocianat de fluoresceina si tetrametil de rodamina), ceea ce a permis explicarea mecanismului infectiilor urinare ascendente.

Fimbriile tip-1, prezente la cele mai multe *Enterobacteriaceae* studiate, se leaga de resturile de D-manoza din structura glicoproteinelor de pe suprafata celulelor eucariote. Daca initial se considera ca fimbriile sunt formate dintr-un numar mare de molecule identice de fimbrilina, proteine dispuse dupa o simetrie helicala, date recente arata ca la bacteriile patogene, pe lânga componenta majora *FimA*, exista si un procent mic de componente minore (*FimF, FimG, FimH*) de tip lectina. Componenta *FimH* este localizata la extremitatea libera a fimbriilor, ca si de-a lungul lor si contine situsul de legare al D-manozei de pe suprafata celulelor eucariote. In acest context, proteina majora - fimbrilina, ar avea un rol structural si de sustinere a adezinei (proteina minora) responsabile de specificitatea de legare de receptorii celulari. In timp ce proteina majora difera ca structura primara intre diferitele specii enterice, adezina minora este conservata la un numar important de specii ale familiei *Enterobacteriaceae.*

Fimbriile tip-1 permit adeziunea de tractul intestinal si de mucoasa intestinului gros. In general actiunea lor asupra epiteliului cailor urinare este contracarata de actiunea inhibitoare a unei glicoproteine cu manoza (proteina Tamm - Horsfall) produsa in rinichi si eliberata in urina, cu rolul de a proteja rinichiul de infectia cu *E. coli*, prin inhibarea legarii fimbriilor tip-1 de receptorul lor specific. In functie de mecanismele de patogenitate, epidemiologie, serotip si manifestari clinice, tulpinile de *E. coli* care determina boli diareice pot fi diferentiate in sase patotipuri numite si *virotipuri* (termen derivat de la *virulenta*) (vezi Principalele grupe de bacterii patogene – Bacili Gram negativi - Fam. *Enterobacteriaceae*).

In functie de mecanismele de patogenitate, epidemiologie, serotip si manifestari clinice, tulpinile de *E. coli* care determina boli diareice pot fi diferentiate in sase patotipuri numite si *virotipuri* (termen derivat de la *virulenta*) (vezi Principalele grupe de bacterii patogene – Bacili Gram negativi - Fam. *Enterobacteriaceae*).

Fimbriile (pilii) P sau Pap (**P**yelonephritis **a**ssociated **p**ili), sunt cunoscute sub diferite denumiri, ca fimbrii Gal-Gal (Gal-gal "binding fimbriae"). Fimbriile P sunt structuri filamentoase asemanatoare cu firele de par (engl. *hair-like*) care faciliteaza legarea si

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

colonizarea mucoasei urinare de catre bacteria *E. coli*. Tulpinile de *E. coli* fimbriate reprezinta o parte din microbiota indigena a intestinului gros la copii si la adulti. In timp ce cresterea lor la acest nivel este asimptomatica, trecerea aceleiasi tulpini de *E. coli* in tractul urinar poate cauza inflamatie si simptome de infectie urinara. In intestinul normal, celulele de *E. coli* se pot lega de globolipide eliberate anterior si la celule intestinale libere, descuamate. Astfel, celulele bacteriene pot exista in numar mare ca celule plutitoare, incapabile de a se lega la suprafata celulelor intestinale. Aceste celule plutitoare sunt in mod normal excretate in materiile fecale, insa atunci când, aceleasi bacterii trec in tractul urinar, o aderenta ferma poate initia raspunsul gazdei. Forma secretata a receptorului GSL se pare ca a aparut in evolutie pentru a proteja intestinul gros de efectele inflamatoare ale microbiotei indigene.

Tabel nr. 2. Adezinele fimbrilare prezente la tulpinile de *Escherichia coli,* asociate cu infectiile cailor urinare umane si cu meningita *neonatorum* .

Tipul de adezina	Caracteristicile situsului de legare	Tipul de celule de care se leaga:		Maladia
		Rinichi	Vezica urinara	
Fimbriile tip 1 (80% din totalul tulpinilor)	Oligomanozide din structura glicoproteinelor	Lumenul tubulilor proximali, peretii vasculari	Stratul muscular, peretii vasculari	Infectii urinare si intestinale
Fimbriile P	α-D-Gal *p*-(1-4) β-D Gal *p* din glicosfingolipide	Lumenul tubulilor distali si proximali, si al canalelor colectoare, endoteliu, glomeruli	Epiteliu, endotelii, stratul muscular	Pielonefrite, infectii urinare
Fimbriile S	Secventele NeuNAc α2-3DG al B1-4D Glc NAc din glicoproteine	Lumenul tubulilor distali si proximali, si al canalelor colectoare, endoteliu, glomeruli	Epitelii, endotelii, tesutul muscular, tesutul conjunctiv	Meningite, infectii ale nou-nascutilor
Fimbriile tip 1C	Necunoscute	Lumenul tubulilor distali si al canalelor colectoare, endotelii	Endotelii	Pielonefrite
Adezina 075X	Hemaglutinant, leaga colagenul tip IV; legarea este inhibata de cloramfenicol	Membrane bazale	Tesutul conjunctiv; legare slaba de epitelii	Infectii urinare

Gal Nac = N-acetil-D-galactozamina; Glc Nac = N-acetil-D-glucozamina.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

E. coli este de departe cel mai comun agent cauzal al infectiilor tractului urinar, la pacientii la care nu exista conditii predispozante. Mai mult decât 80 % din toate tulpinile de *E.coli* exprima fimbrii P, care sunt recunoscute in prezent ca un factor determinant-cheie al virulentei tulpinilor uropatogene. Receptorii specifici pe care îi recunosc fimbriile P sunt glicolipide care conþin α-Gal (1→4)- β-Gal, care sunt prezenti in tesutul renal si pot explica rata mare de infectivitate a acestui organ de catre bacteriile P-fimbriate. A devenit evident faptul ca pe lânga facilitarea inceputului unei infectii bacteriene, fimbriile exprimate de diferite bacterii patogene pot modula supravietuirea in organismul gazda prin modificarea interactiunii bacteriilor cu diferite celule ale raspunsului inflamator, inclusiv cu fagocitele. Faptul ca un numar mare de leucocite polimorfonucleare neutrofile sunt adesea gasite in urina pacientilor cu infectii ale tractului urinar este o alta indicatie a implicarii active a neutrofilelor in apararea gazdei la nivel local. Adezinele tip Pap G protejeaza insa celulele fimbriate de *E. coli* de activitatea bactericida a neutrofilelor.

De asemenea, multe studii epidemiologice arata ca alimentatia naturala a nou- nascutilor îi protejeaza de infectiile intestinale. Efectul protector al laptelui matern este atribuit sIgA, dar si unor factori de aparare nespecifici cum ar fi lactoferina, lizozimul, factorul *bifidus* si oligozaharidele. Efectul protector este considerat a fi si rezultatul continutului in compusi care actioneaza ca analogi ai receptorilor de adezine bacteriene si enterotoxine. Laptele uman contine multe glicocomponente, dintre care unele sunt bogate in oligozaharide fucozilate, cum ar fi lactoferina si componentul secretor (CS) in stare libera, care (pe langa alte roluri) ar putea juca rolul de analogi de receptori. S-a demonstrat ca oligozaharidele fucozilate inhiba adeziunea tulpinilor de E. coli enterotoxigene si enteropatogene.

Cele mai multe bacterii au doua sau mai multe tipuri de fimbrii cu specificitati de legare diferite. Prin aceasta creste numarul celulelor sensibile, cu receptori diferiti, cu care se pot asocia bacteriile. De multe ori, exprimarea adezinelor nu este simultana, ci succesiva, corelate cu diferite faze ale infectiei. Astfel aderenta apare importanta nu numai in initierea unei infectii, ci in intreaga sa evolutie.

Un factor agravant al infectiei, dar cu valoare adaptativa pentru bacterii este *capacitatea fimbriilor de a suferi variatii de faza.* Acesta explica pe de o parte, heterogenitatea tulpinilor de *E. coli* din caile urinare si capacitatea lor de a adera la diferite niveluri ale cailor urinare, iar pe de alta parte capacitatea de a evita actiunea anticorpilor, cu specificitate fata de adezinele exprimate intr-o faza anterioara. Acest fenomen al variatiei antigenice reprezinta un mecanism

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

prin care anumite specii de bacterii patogene sintetizeaza succesiv un numar mare de variante diferite ale moleculelor sau structurilor de suprafata, pentru a scapa de apararea imunitara a organismului gazda. El asigura totdeauna supravietuirea unei parti din populatia de microorganisme infectante, chiar in prezenta unui raspuns imun foarte activ, pornind de la care se reface o populatie de microorganisme cu o structura antigenica diferita .

Dintre bacterii exemplul tipic de variatie antigenica il constituie *Neisseria gonorrhoeae,* comparata datorita acestei particularitati, de catre B. Brett Finlay si S. Falkow, cu un "cameleon iscusit". Celulele de *N. gonorrhoeae* exprima in orice moment al existentei lor un tip caracteristic de fimbrii, datorita functionarii unei singure gene pentru fimbrilina.Proteina are o masa moleculara care variaza intre 18 – 24 kDa ; pilii maturi mediaza aderenta la un diferite tipuri de celule eucariote care influenteaza interactiunile cu epiteliile, endoteliile si fagocitele. Genomul bacteriei contine insa mai multe secvente incomplete ale genelor pentru fimbrilina, care sunt insa "tacute", neexprimate (engl. *silent genes*). Ele contin pe lânga unele secvente conservate si unele foarte diferite. Functionarea lor este conditionata de fenomenul de *conversie a genelor*, care se produce printr-un mecanism asemanator celui descris sub denumirea de *modelul casetei*, care implica existenta unui situs de exprimare si deplasarea aleatorie a uneia din genele "tacute" in acest situs, care inlocuieste si deplaseaza gena anterior functionala. Astfel se sintetizeaza un nou tip de molecule de fimbrilina. Fenomenul explica incercarile nereusite de a obtine un vaccin anti-adezine pentru profilaxia infectiilor gonoreice, chiar si in cazul utilizarii unui vaccin polivalent. Un alt motiv de insucces al vaccinurilor anti-adezine in general, il constituie, dupa opinia unor autori,concentratia mica a anticorpilor specifici la nivelul mucoaselor.

Fenomenul de variatie antigenica produs *in vivo* ar fi determinat de presiunea imuna, care ar putea accelera evolutia sau selectia unor noi variante antigenice. Acest mecanism compenseaza lipsa sexualitatii propriu-zise si permite bacteriilor patogene o rapida si eficienta variatie fenotipica care le asigura diversitatea si adaptarea la presiunea imunologica a gazdei.

Fimbriile tip - 1C sunt in general asociate cu fimbriile P si maresc potentialul invaziv al acestora.

Fimbriile S nu sunt asociate cu patogenitatea. La *E.coli*, desi celulele recunosc glicoconjugate cu acid sialic, legarea lor fiind blocata cu inhibitori prezenti in concentratie normala in urina (in special de proteina Tamm - Horsfall).

Adezina 075 X favorizeaza colonizarea cailor urinare inferioare si reprezinta un factor important de virulenta, prin legarea de epiteliile lezate ale cailor urinare superioare.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Fimbriile tip 3 sunt produse de catre multi membri ai fam. *Enterobacteriaceae*, fiind detectate mai ales la tulpini apartinând genurilor *Klebsiella, Enterobacter, Serratia , Proteus* si *Providencia* si codificate de gena *mrkD.* Speciile de *Salmonella* rar produc acest tip de fimbrii, iar la tulpinile de *E. coli* nu au fost semnalate. Fimbriile de tip 3 prezente la enterobacterii sunt morfologic asemanatoare, netubulare, cu diametru mic (2- 4 nm); acest tip de fimbrii mediaza aglutinarea manozo-rezistenta a eritrocitelor tratate cu acid tanic, adera la colagenul tipV si este frecvent prezenta la tulpinile de *K. oxytoca.*

2. Capsula. Unele bacterii au proprietatea de a elabora in anumite conditii de mediu, un anumit material macromolecular cu caracter vâscos, gelatinos. Substantsle mucoide capsulare sunt de regula de natura polizaharidica (fiind numite exopolizaharide bacteriene), dar pot fi si de natura polipeptidica sau mixta (la *B. anthracis* si alti sporulati aerobi - polimeri de acid D-glutamic), motiv pentru care a fost introdus conceptul de E.P.S. – engl. *extracellular polymeric substances* - pentru a reuni toate substantele macromoleculare pericelulare. In functie de structura si raporturile sale cu celula bacteriana, substanta mucoida se poate prezenta sub urmatoarele forme:

1. microcapsula (cu o grosime sub 0,2 μm), alcatuind un strat fin in jurul celulei, detectabil numai prin metode imunologice - de exemplu, antigenele de suprafata, care confera virulenta bacteriilor patogene);
2. capsula propriu-zisa sau macrocapsula (cu grosime depasind 0,2 μm, formatiune morfologic distincta si care poate fi evidentiata prin metode citochimice);

Capsula apare la microscop ca un halou incolor in jurul celulei bacteriene, cu dimensiuni variabile, fiind lipsita de membrana morfologic diferentiata. Capsula este strâns aderenta de peretele celular, datorita legarii polizaharidului capsular de acesta prin legaturi ionice si uneori covalente.

Prezenta capsulei da culturilor pe medii lichide un caracter vâscos, siropos, datorita difuzarii in mediu a unora dintre sustantele capsulare. Coloniile pe medii solide au un aspect umed, lucios si dovedesc o consistenta mucoasa atunci când sunt ridicate cu ansa de pe mediu. Consistenta vâscoasa, gelatinoasa, cât si refringenta caracteristica a acestor formatiuni se explica prin natura polizaharidica a moleculelor costituente (homopolizaharide si heteropolizaharide) si prin gradul lor inalt de polimerizare.

Uneori, compozitia chimica a capsulei (codificata genetic) este corelata cu specificitatea antigenica a celulelor respective si permite identificarea lor serologica in scop de diagnostic. Pe acest criteriu, al unor mici diferente in compozitia polizaharidelor capsulare la pneumococ (*Streptococcus pneumoniae*), au fost descrise peste 80 de tipuri serologice. La *E. coli* se cunosc

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

in jur de 70 de tipuri capsulare, materialul capsular fiind constituit din polizaharide acide localizate in membrana externa. Aceste tulpini pot produce numai infectii extraintestinale; tipurile K1 si K5 sunt cele mai comune printre tulpinile patogene de colibacili. Capsulele K1 sunt constituite din acizi polisialici si sunt identici cu polizaharidul capsular al bacteriei *Neisseria meningitidis b. A*numite tipuri capsulare sunt slab imunogene, fapt care se datoreaza asemanarii materialului capsular cu anumite substante ale gazdei. Raspunsul imun slab al gazdei favorizeaza penetrarea bacteriilor in tesuturile gazdei si imbolnavirea acesteia.

Semnificatie biologica. Capsula nu este parte integranta din celula bacteriana, ci este o structura inerta, accesorie, cu caracter adaptativ, care rezulta din activitatea ei metabolica si care poate fi indepartata, fara a afecta viabilitatea celulei. La bacteriile patogene, capsula exercita un rol protector fata de actiunea fagocitelor, fie direct, impiedicând adeziunea la suprafata fagocitului, fie indirect, prin efectul chimiotactic negativ, antifagocitar, al substantelor de constitutie ale capsulei. Datorita acestui fapt, bacteriile patogene capsulate au o virulenta mai mare pentru om si animale, iar pierderea capsulei poate determina pierderea capacitatii de aderenta, invazie si implicit a virulentei.

3. **Glicocalixul** este o masa de filamente polizaharidice (reunite impreuna cu substantele capsulare in conceptul integrator de E.P.S.), atasate de lipolizaharidele din membrana externa a bacteriilor Gram negative sau pe suprafata mureinei bacteriilor Gram pozitive, formând in ansamblu o structura ca o pâsla pe suprafata celulei si asigurând fixarea ferma si adesea specifica a acesteia, de alte celule sau suporturi neanimate. Uneori, diviziunea bacteriilor in interiorul unui glicocalix poate produce o microcolonie de celule inglobate intr-un glicocalix comun.

Glicocalixul se formeaza numai la celulele aflate in conditii naturale, care apar la microscopul electronic de baleiaj inconjurate de o retea de fibre, ce adera unele de altele si de alte celule si suprafete inerte. S-a relevat faptul ca majoritatea suprafetelor in natura sunt acoperite de un asa-numit "biofilm", reprezentat de bacterii incluse intr-un film sau pelicula, intarita de polimerul adeziv secretat de bacteriile respective. In cazul in care acest polimer contine polizaharide specifice, el este mentionat ca "glicocalix". Fenomenul de adeziune prin intermediul glicocalixului a trezit mult interes pentru cercetarile de microbiologie orala. De exemplu, dupa ce diferite specii de streptococi colonizeaza diferite suprafete ale cavitatii bucale (limba, dintii), polizaharidele excretate intaresc adeziunea, conducând la aparitia placii dentare.

Placa dentara este o structura complexa formata din bacterii strâns asociate, inclavate intr-o masa amorfa, numita *matricea placii*, care localizeaza si concentreaza la nivelul sau activitatile chimice implicate in cariogeneza. Acumularile bacteriene din cavitatea bucala se

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

prezinta majoritar sub forma de biofilme care rezulta dine interactiuni intre diferitele componente ale mediului bucal si componenta bacteriana ; termenul generic de *placa dentara* este utilizat pentru a descrie aceste biofilme. Placa dentara se dezvolta intr-un mediu complex, populat de diferite tipuri de microorganisme, expuse multor interactiuni si variatii diurne, care tin de particularitatile gazdei, de compozitia dietei etc. Bacteriile formeaza 60-70 % din volumul placii (reprezentate de mai mult de 300 de taxoni bacterieni care au putut fi identificati pâna in prezent in cavitatea bucala umana, ceea ce demonstreaza marea diversitate a microbiotei proprii acestui ecosistem), restul fiind reprezentat de matrice, respectiv de polimeri glucidici bacterieni extracelulari, de macromolecule din saliva. Colonizarea matricei este selectiva, speciile prezente pe suprafata dintelui fiind diferite de cele din mucoasa bucala, din placile subgingivale, din saliva. Cauza acestor deosebiri este capacitatea de legare selectiva a bacteriilor de suprafete.

Formarea placii. Legarea bacteriilor nu se face de smaltul pur, curat, ci de un film organic, *pelicula salivara*, formata prin depunerea mucinei din saliva, pe suprafata dintelui (fig.5). Este probabil ca acizii organici si unele enzime bacteriene ar contribui la precipitarea mucinei, favorizând legarea ei de dinte.

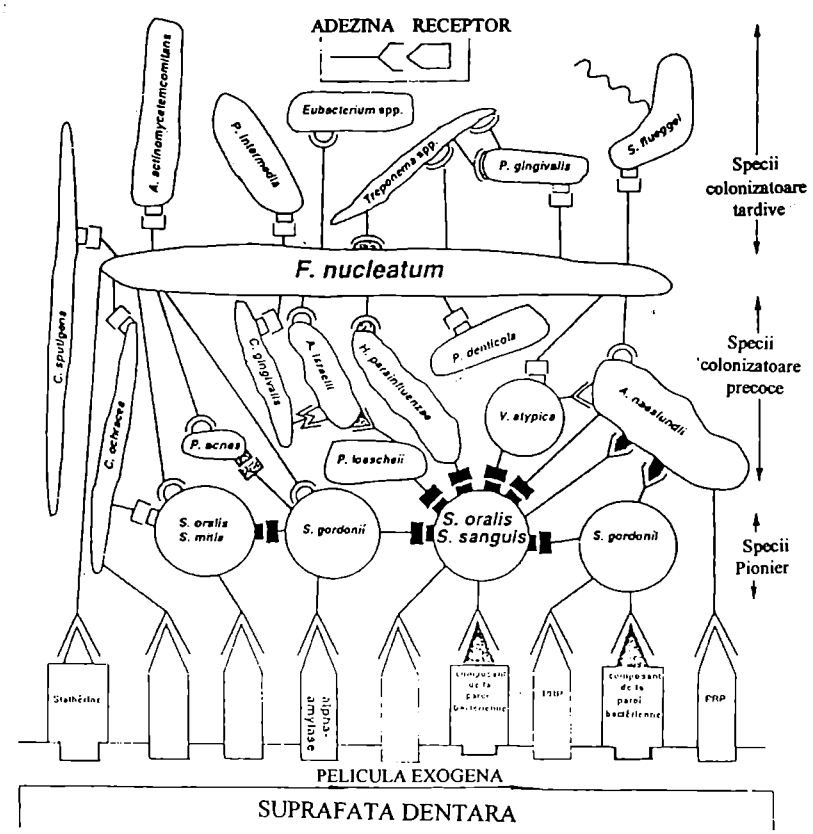


Fig. 5. Reprezentarea schematica a bacteriilor care interactioneaza cu pelicula care acopera smaltul dentar, compusa din mucine si alte micromolecule salivare adsorbite la smaltul mineral. Bacteriile poseda liganzi *lectin-like* care se pot lega de anumite tipuri de molecule de mucine din pelicula salivara.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

O specie colonizatoare timpurie a suprafetei dintelui este *Streptococcus gordonii* (speciile genului *Streptococcus* constituie in jur de 85% dintre speciile–pionier dintre bacteriile cultivabile, prezente pe suprafetele dentare la patru ore dupa profilaxia cu antibiotice), un component comun al placii supragingivale: atasarea initiala, ca si in cazul altor specii, presupune interactiuni specifice intre adezinele bacteriene si componente salivare adsorbite. Cresterea numarului bacteriilor si colonizarea consecutiva este dependenta de acumularea glucanului, sintetizat din fructoza, in prezenta enzimelor produse de specia *Streptococcus mutans*. Aceasta specie bacteriana este capabila de a sintetiza glucani insolubili, care favorizeaza colonizarea suprafetei dintelui. Enzimele implicate in acest proces sunt numite *glucozil transferazele* (GT): dupa scindarea zaharozei in glucoza si fructoza (sub actiunea invertazei streptococice), una dintre GT numita *dextranzaharaza* polimerizeaza glucoza cu formare de glucan solubil in apa (care contine predominant legaturi α- 1, 6- glucoza) ; o alta GT, numita *mutansintetaza*, participa la sinteza de glucan insolubil in apa (care contine predominant legaturi α- 1, 3- glucoza); pentru a sintetiza glucan insolubil, aceasta enzima necesita fie dextran exogen, fie sinteza concomitenta de glucan solubil. Glucanul adera de smaltul dentar, iar biosinteza lui continua datorita prezentei GT in reteaua glicocalixului, care se dezvolta in continuare, capturând mai multe celule bacteriene din aceeasi specie sau din specii diferite (de exemplu: *Streptococcus salivarius*) care se multiplica pe seama resturilor alimentare, rezultând un depozit galbui foarte aderent la dinti, care rezista la indepartarea fiziologica (prin fluxul salivei, masticatie, miscarile limbii), nu insa si la periaj energic - *placa dentara* - la nivelul careia are loc initierea cariei. Mutantele incapabile sa sintetizeze α -1,3 - glucan, insolubil, esential pentru cariogeneza, au o capacitate redusa de adeziune *in vivo* si *in vitro*, si implicit, virulenta scazuta in cariogeneza.

Aceaste specii pot fi gasite si pe mucoasa bucala, dar pot fi si agenti ai endocarditei infectioase. Suprafata dorsala a limbii este colonizata cu *S. salivarius* (Wicken, 1980).

In etapa urmatoare a formarii placii dentare, se produc doua tipuri de interactiuni ale bacteriilor specifice:

1. legarea lor selectiva de pelicula salivara;
2. multiplicarea bacteriilor aderente, cu posibilitatea unor interactiuni specifice adezive si coezive, intre bacterii si matricea placii, ca si intre bacteriile colonizatoare ale peliculei salivare.

Colonizarea incepe cu adsorbtia selectiva a bacteriilor din saliva, pe suprafata peliculei salivare sub forma de celule izolate sau de mici grupuri. Procesul este foarte selectiv, dovada si faptul ca microorganismele care adera preponderent (*Streptococcus sanguis* si *Actinomyces viscosus*), cu un rol esential in initierea genezei placii, nu sunt cele mai numeroase din saliva

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

(aprox. 10^3 celule bacteriene/ ml). Bacteriile legate de pelicula incep sa se multiplice, la inceput dispuse aleatoriu, formând microcolonii si apoi un strat bacterian extins, de care adera noi bacterii din mediu.

Mecanismele de legare a bacteriilor in placa dentara sunt supuse acelorasi reguli generale ale adeziunii cu unele elemente particulate : diferitele macromolecule salivare favorizeaza aparitia de agregate bacteriene, dintre care cele mai mici adera la pelicula salivara. Materialul polimeric se leaga de pelicula prin legaturi de hidrogen, ionice si hidrofobe, in prezenta Ca^{2+}. Adsorbtia proteinelor salivare si a altor substante pe hidroxiapatita dentara se realizeaza pe calea atractiilor electrostatice ce implica participarea unor grupari fosfat de pe suprafata minerala. Un rol semnificativ revine acizilor teicoici, care contribuie la sarcina electronegativa a bacteriilor, fiind capabili sa formeze punti cu Ca^{2+} intre smalt si pelicula. In legarea specifica, ireversibila, un rol esential revine adezinelor de pe suprafata bacteriilor (de exemplu, fimbrii), care reprezinta un adevarat cod chimic preformat, menit sa permita recunoasterea si legarea de anumite macromolecule cu rol de receptori specifici de pe dinte si pelicula.

Formarea placii dentare este un proces complex in care agregarea interbacteriana (sau coagregarea) joaca un rol cheie. Identificarea si caracterizarea biochimica a mediatorilor moleculari specifici ai coagregarii intergenerice a trezit un interes considerabil. Raspunzatoare pentru coagregarea intergenerica sunt interactiunile dintre adezinele bacteriene si receptorii glucidici, care conduc la o depunere secventiala a bacteriilor caracteristice placii dentare umane. Examinarea mecanismului coagregarii poate contribui la intelegerea ecosistemului microbian complex, prezent in cavitatea bucala umana. Fenomenul coagregarii a fost semnalat prima data de catre Gibbons si Nygaard in 1970, care au gasit ca anumite tulpini ale placii bacteriene agrega când sunt mixate. Studii ulterioare au identificat mediatorii moleculari ca fiind proteine complementare si receptori glucidici, folosind inactivarea prin caldura sau prin tratare cu proteaze a uneia din cele doua celule partenere, sau folosind fie zaharuri libere, fie anticorpi monoclonali, ca inhibitori ai coagregarii. Prin extinderea acestor studii se pot gasi agenti terapeutici pentru a intrerupe sau a face reversibila formarea placii dentare si prin analogie, alte fenomene de aderenta microbiana dependente de interactiuni proteina / glucid.

Rolul anticorpilor salivari in protectia impotriva bacteriilor cariogene este in prezent un subiect controversat. S-a demonstrat ca raspunsul imun impotriva cariilor implica s-Ig A (imunoglobuline secretoare), transportate prin celulele epiteliale ale glandelor salivare prin intermediul unui receptor pentru poli-Ig. Este binecunoscut faptul ca majoritatea adultilor prezinta un numar de carii dentare, fiind deci susceptibili la carii (SC), in timp ce numai putini

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

indivizi sunt rezistenti la carii (RC). Exista date care aratata ca o susceptibilitate scazuta la carii dentare este asociata cu nivele crescute de anticorpi s-Ig A fata de celulele intregi de *S. mutans.* Nu s-a observat o crestere selectiva a subclasei de s-Ig A_2 rezistente la proteinaze. Cercetarile au aratat ca anticorpii indusi pe cale naturala impotriva tulpinilor de *S. sobrinus* (serotip al speciei *S. mutans) si S. sanguis*, chiar in cantitati mari nu sunt suficienti pentru a inhiba procesul de cariogeneza. acest mijloc de protectie al organismului este depasit de catre bacteriile patogene.

Semnificatie biologica. Dupa Costerton, adevarata suprafata functionala a tuturor celulelor (bacteriene, vegetale si animale) este glicocalixul - o retea ca o pâsla de fibre polizaharidice. Glicocalixul este prezent numai in medii naturale competitive, populate.de mai multe tipuri de bacterii, in care selectia favorizeaza celulele protejate de glicocalix, capabile sa adere prin intermediul lui la diferite substraturi.

Prezenta glicocalixului, care determina uneori formarea de microcolonii bacteriene, creeaza conditii favorabile de nutritie, prin mentinere si concentrarea enzimelor degradative eliberate de bacterii si active pe substratul de fixare – de ex., celule animale. Aceasta forma microcoloniala de crestere a fost observata intr-o varietate de infectii bacteriene, incluzând infectiile asociate dispozitivelor protetice si osteomielitele. In acelasi timp el creeaza un rezervor de hrana pentru bacterii prin legarea diferitilor ioni si molecule care provin din mediu sau sunt eliberate prin digestia enzimatica a celulelor moarte, care sunt astfel recirculate.

Datorita glicocalixului, bacteriile se leaga de structurile polizaharidice similare de pe suprafata celulelor animale, prin legaturi polare formate pe calea ionilor. In cazul unor bacterii patogene, fixarea are un grad important de specificitate pentru glicocalixul celulei-gazda (de exemplu, vibrionul holeric se leaga de portiunea apicala a celulelor intestinale umane cu "margine in perie", gonococul de celulele uretrale.

La unele bacterii Gram negative capsulate cum ar fi *Klebsiella pneumoniae,* care se numara printre cauzele de morbiditate si mortalitate prin infectii nosocomiale (studiile epidemiologice au relevat ca rezervorul de infectie este tractul digestiv al pacientilor), s-a observat un aspect interesant: o caracteristica a cresterii acestor bacterii este producerea nu numai a unui strat polizaharidic capsular (CPS) subtire, ci si a unei mari cantitati de CPS liber, care este impregnat cu LPS toxic, contribuind la patogenitate. CPS liber, circulant, poate lega si neutraliza anticorpii care ar putea opsoniza si ataca bacteriile; productia de anticorpi opsonizanti este un aspect important al imunitãtii fata de *K. pneumoniae*, demonstrat de analizele *in vitro* care au identificat anticorpi anti-CPS specifici ca opsonine, importante pentru aderenta la membrana fagocitelor. *In vitro* celulele de *K. pneumoniae* adera atât la substratul celular, cât si

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

intre ele, deci prezinta o aderenta agregativa mediata de stratul capsular, care explica dificultatea tratarii infectiilor determinate de acest patogen oportunist. A fost identificata o adezina nefimbriala denumita CF29K, care determina un fenotip de aderenta difuza, codificata de operonul *cf29,* localizat pe o plasmida conjugativa impreuna cu alte gene care codifica factori de virulenta (de ex. aerobactin) si gene de rezistenta la antibiotice (β- lactamaza). Pentru rezolvarea infectiilor produse de *K. pneumoniae* s-a incercat stimularea imunitatii, utilizând antigene capsulare K-specifice ca vaccinuri anti-adezine. Imunoterapia K-specifica a trebuit sa acopere numeroase serotipuri dintre cele 70 de tipuri capsulare serologic distincte identificate in cadrul acestei specii. Un vaccin 24-valent K-specific, aflat in prezent in faza de testare clinica, acopera 60-70 % din izolatele bacteriemice de *K. pneumoniae.* Raspunsul imun in imunoglobuline este crescut dupa vaccinare. Pentru aceasta bacterie si alte bacterii capsulate, cantitatea de CPS este corelata direct cu virulenta. A fost utilizat *in vitro* salicilatul pentru a reduce exprimarea CPS de catre câteva serotipuri de *K. pneumoniae*; s-a demonstrat recent ca inhibarea exprimarii capsulei cu salicilat creste inglobarea fagocitara a bacteriilor. De asemenea expunerea celulelor la concentratii subletale de antibiotic (brodimoprim), dar care poate inhiba sinteza structurilor de suprafata, a redus aderenta bacteriei la epiteliul traheal cu 41-67%.

Prezenta glicocalixului poate determina un efect protector complex pentru celule, asigurând fixarea si mentinerea acesteia in mediile natural sterile (de exemplu, caile urinare) fara a fi indepartate de fluxul urinar. De asemenea, impiedica fagocitarea bacteriilor de catre leucocitele polimorfonucleare, ca si accesul si fixarea anticorpilor specifici din organismul infectat, deci protejeaza bacteriile de reactiile de aparare ale gazdei. S-a demonstrat *in vitro* ca glicocalixul inhiba functiile fagocitare normale, cum ar fi mobilitatea de-a lungul gradientului chemotactic si producerea de metaboliti intermediari ai oxigenului, ca si raspunsul proliferativ al celulelor mononucleare din sângele periferic la mitogene, cum ar fi fitohemaglutinina.

Studii recente demonstreaza ca glicocalixul stafilococilor coagulazo-negativi poate activa producerea de catre monocite a prostaglandinei E_2 (PGE_2), ceea ce contribuie la inhibarea proliferarii limfocitelor T. PGE_2 joaca un rol semnificativ in raspunsul inflamator acut. Apare cumva paradoxal ca glicocalixul care ar putea fi astfel aparent benefic stafilococilor coagulazo-negativi in initierea infectiilor, in acelasi timp stimuleaza monocitele sa secrete produsi proinflamatori. Exista numeroase exemple in care bacteriile, prin structurile lor de suprafata, ca si prin metabolitii lor care pot fi factori de virulenta, induc sinteza de citokine de catre celulele organismului gazda, influentând prin aceasta evolutia unui proces infectios.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

4. Flagelii sunt apendice filamentoase, unice sau multiple, dispuse pe suprafata bacteriilor, reprezentând organitele de locomotie tipice organismelor procariote, implicate si in chemotaxie, deci in deplasarea orientata preferential, sub efectul unor gradiente de concentratie ale diferitelor substante chimice aflate in mediul de viata al bacteriilor.

S-a dovedit ca rolul flagelilor este mult mai complex in biologia celulelor bacteriene, prezenta lor la bacteriile patogene constituind un factor de virulenta, prin functia de stimulare a adeziunii la diferite epitelii si prin capacitatea de a facilita patrunderea prin stratul de mucus ce acoperã tesuturile epiteliale.

Rolul lor in virulenta este controversat, desi este acceptata ideea potrivit careia capacitatea bacteriilor patogene de a-si modifica pozitia in spatiu prin mobilitate activa este de importanta esentiala in virulenta. Rolul flagelilor in virulenta a fost studiat, in special, cu ajutorul mutantelor neflagelate sau al mutantelor "neinteligente" (celule flagelate cu defecte in sistemul de transductie a energiei sau flageli care se rotesc, dar prezinta anomalii de raspuns chemotactic). Mutantele neflagelate sau flagelate, dar nechemotactice de *Salmonella sp.* si *Campylobacter jejuni* colonizeaza mai greu suprafata epiteliilor decât cele mobile si chemotactice. In cazul bacteriei *Pseudomonas aeruginosa* s-a demonstrat ca tulpinile mobile care infecteaza arsurile sunt mai virulente decât cele imobile. Mai mult, varianta mobila a bacteriei ar fi mai virulenta, formând biofilme la nivelul tesutului pulmonar al bolnavilor cu fibroza chistica, dupa mecanismul descris pentru mediile naturale subacvatice: biofilm alcatuit din microcolonii bacteriene, acoperite de o matrice exopolizaharidica de la marginile careia se elibereaza celule foarte mobile care invadeaza tesutul sanatos.

La *Vibrio cholerae* s-a constatat ca motilitatea si chemotaxia constituie factori de virulenta. Prin tratarea bacteriilor cu anticorpi antiflagelari motilitatea este inhibata. Aderenta are rolul de a reduce eliminarea bacteriilor prin peristaltism si in acelasi timp ofera bacteriilor un mediu mai favorabil pentru crestere. S-a demonstrat ca mutantele imobile, dar normal enterotoxigene , au o virulenta diminuata.

Mobilitatea in general ar fi un factor important pentru virulenta. Astfel, capacitatea de deplasare rapida in medii vâscoase, cum sunt cele din organism, observata la *Borrelia, Leptospira si Treponema,* ar fi un factor esential pentru evitarea fagocitozei, fiind capturate cu mare dificultate de catre fagocite. La aceste bacterii cu lungime mare si foarte mobile (ulterior si la enterobacteriile conditionat-patogene, ca si la microfungi) a fost semnalat un tip special de fagocitoza – *coiling* fagocitoza, caracterizata prin formarea unui singur pseudopod, care se

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

rasuceste in jurul bacteriei, tragând-o in interiorul fagocitului ; nu se cunoaste semnificatia precisa a acestui proces (fig. 6).

De asemenea, la *Mycoplasma sp.* infectiozitatea este dependenta de capacitatea celulelor de a se deplasa prin alunecare (datorita lipsei peretelui celular), de a patrunde prin stratul de mucus si de a ajunge astfel in contact cu receptorii de adezine prezenti pe membrana

a) b) c)

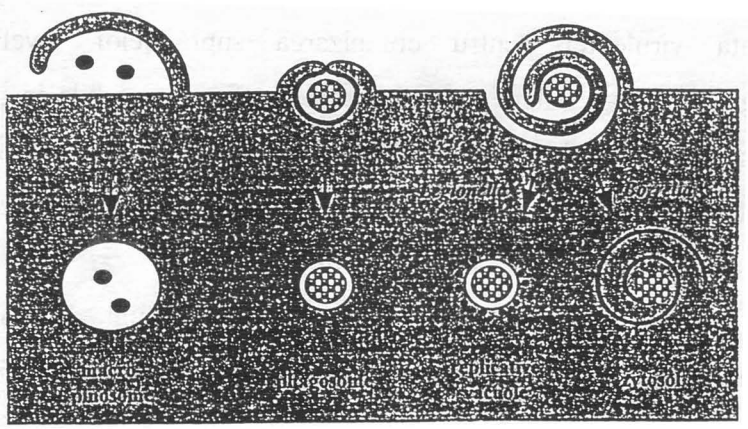


Fig. 6. Schema reprezentând caracreristicile morfologice ale macropinocitozei (a), ale fagocitozei conventionale (b) si ale fagocitozei tip *coiling* (prin infasurare) (c).

celulelor-gazda, aderenta fiind favorizata de asemanarea biochimica a celor doua membrane. Prin tehnica microcinematografiei cantitative, s-a demonstrat ca tulpinile virulente de *M. pneumoniae* sunt mobile, iar cele avirulente sunt imobile si au o aderenta redusa. In ciuda acestor fapte concrete, concluzia este totusi ca, in absenta chemotaxiei, mobilitatea singura ar reprezenta un avantaj minor pentru virulenta bacteriana.

Flagelii sunt structuri imunogene (antigene H) fata de care organismul gazda produce anticorpi. Ca rezultat al coevolutiei gazda - parazit, acesta din urma "contraataca" sintetizând antigene flagelare diferite (Ag H_1 si Ag H_2); fenomenul a fost descris sub denumirea de "variatie de faza a antigenelor flagelare de la *Salmonella sp.*" , ca un sistem de variatie de faza, controlat genetic de genele structurale cromosomale H_1 si H_2; fenomenul a fost semnalat inca din 1929 de catre Andrews. Dupa unii autori, variatia de faza a flagelilor, cu rol deosebit in patogenitate si in capacitatea bacteriilor de a se adapta la diferite medii ostile in cursul infectiei si de "a insela" efectorii sistemului imunitar, s-ar realiza aleatoriu o data la fiecare 10^3-10^5 generatii.

5. "Curli". La *E. coli* s-a semnalat prezenta unei a treia clase de organite de suprafata (in afara de flageli, pili / fimbrii) pentru care s-a propus denumirea de "curli" (engl. *curl* = bucla, ondulatie, incolacitura) (Olsen si colab., 1989).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Sunt structuri de suprafata rasucite, rigide, cu diametrul de circa 2 nm, compuse dintr-un singur tip de subunitati, *curlina*, care difera de toate celelalte proteine piline cunoscute, fiind sintetizata in absenta unui peptid semnal clivabil. Agregarea laterala a fibrelor individuale produce structuri considerabil mai groase. Desi gena care codifica aceasta subunitate structurala "crl" este prezenta si transcrisa la majoritatea izolatelor naturale de *E. coli*, numai anumite tulpini sunt capabile de a asambla subunitatile proteice in *curli*. Acest proces de asamblare se desfasoara preferential la temperaturi sub 37°C. Capacitatea de a media legarea fibronectinei poate fi o proprietate asociata virulentei pentru colonizarea suprafetelor invelite in fibronectine (glicoproteine cu greutate moleculara mare, prezente in forma solubila in plasma si alte lichide biologice si in forma insolubila in celule, având functia de opsonine nespecifice; adera la resturi celulare, de exemplu, de tesutul necrozat al plagilor, favorizând infectarea acestora). Structuri tip « curli » au fost evidentiate si la *Salmonella typhimurium*.

6. Stratul proteic S. Asa-numitul *strat S* , reprezentat de doua straturi proteice paracristaline, face parte dintre cele mai primitive structuri parietale, fiind prezent la toate eubacteriile.

Semnificatia biologica. Se considera de asemenea ca stratul S este implicat in adeziunea celulara si recunoastere. O atentie deosebita s-a acordat stratului S prezent la bacteriile patogene, la care este considerat ca factor de virulenta, necesar pentru atasarea la suprafete, etapa semnificativa in colonizarea si initierea unei infectii la o gazda sensibila, la care exista receptori celulari pentru aceasta structura. Aceasta adezina a fost mult studiata la *Aeromonas salmonicida*, dar si la numeroase bacterii patogene pentru om, cum ar fi : *Helicobacter pylori, Chlamydia sp., Rickettsia sp., Treponema sp., Bordetella sp., Bacillus sp., Bacteroides sp., Clostridium sp.*

*

S-a demonstrat ca unele bacterii patogene pot avea mai multe tipuri de adezine. Bacteria *Pseudomonas aeruginosa* este un exemplu tipic de microorganism cu multiple mecanisme de aderenta, care includ exopolizaharide, fimbrii, adezine specializate pentru acidul sialic, manoza, N-acetil manozamina, interactiuni proteina-proteina, interactiuni hidrofobe (adezine de lipide).

P. aeruginosa este un patogen oportunist care produce complicatii majore la pacientii cu fibroza chistica, dar si o cauza semnificativa a morbiditatii la cei cu arsuri, cancer si alte boli in care este prezenta imunodepresia. Desi multi produsi extracelulari ai bacteriei contribuie la virulenta sa, structurile filamentoase cunoscute ca pili tip IV, joaca un rol major favorizând aderenta bacteriilor la celulele epiteliale. Infectiile cronice ale tractului respirator cu tulpini de *P. aeruginosa* care produc mari cantitati de exopolizaharide mucoide (MEP) = alginati, constituie

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

factorul patogen major al bolilor pulmonare cronice si al mortalitatii prin acestea, la pacientii cu fibroza chistica. Mecanismul initierii infectiei la acesti pacienti, se explica prin dereglarile in biochimia si fiziologia mucusului respirator al pacientilor si exprimarea adezinelor pentru celulele epiteliale si mucine de catre celulelele de *P. aeruginosa*. Tulpinile care initiaza infectia sunt fenotipic diferite de cele gasite in infectia cronica. Mai exact, tulpinile din faza initiala a infectiei au tendinta sa elaboreze un strat lipopolizaharidic (LPS) neted continând lanturi O lungi, care sunt rezistente la efectul bactericid al serului. Din contra, tulpinile care colonizeaza in mod cronic, sufera variatii de faza care constau in emergenta unor tulpini cu LPS rugos, sensibile la actiunea serului si care produc mari cantitati de MEP (LPS tip A si B). Urmeaza un raspuns imun intens la multiplele antigene bacteriene, incluzând MEP, dar anticorpii produsi in timpul infectiei sunt ineficienti in eliminarea bacteriilor. S-a sugerat ca incapacitatea pacientilor cu fibroza chistica de a actiona eficient in infectiile cronice cu *P. aeruginosa*, este asociata cu producerea de anticorpi anti-MEP care nu pot media citotoxicitatea anticorpo-dependenta a bacteriilor *in vitro*. S-a demonstrat ca protectia rozatoarelor impotriva infectiilor endobronhiale cu tulpini de *P. aeruginosa* mucoide este mediata de anticorpi opsonici, dar nespecifici fata de MEP. Aceste opsonine depoziteaza si C3b la suprafata stratului de MEP, unde sunt incapabile sa interactioneze cu receptorii de complement de pe leucocitele polimorfonucleare, in special *in vivo* , unde bacteriile cresc in microcolonii incluse in MEP. Studii recente vin in sprijinul acestei idei: anticorpii serici de la pacientii de fibroza chistica, colonizati in mod cronic, au o capacitate semnificativ redusa de a media omorârea celulelor mucoide de *P. aeruginosa* crescute ca un biofilm *in vitro*. Dupa unii autori, alginatul si alte antigene (LPS) ar determina o stimulare policlonala a limfocitelor B, care ar avea ca efect hipergamaglobulinemia din cursul fibrozei chistice; insa severitatea acestei boli se coreleaza invers proportional cu titrul anticopilor, paradox ce poate fi explicat prin calitatea inadecvata a anticorpilor care nu actioneaza ca opsonine, dar contribuie la inflamatia mediata de complexe imune (hipersensibilitate tip III).

Un alt exemplu de bacterie care poseda multiple structuri adezive (fimbrii, capsula si LPS) la substratul celular sensibil este *Porphyromonas gingivalis;* este o bacterie Gram negativa anaeroba, pigmentata in negru, asociata cu câteva boli ca periodontita adultului, periodontita juvenila generalizata, abcese periodontale si periodontita refractara. Fimbriile acestei bacterii sunt implicate in aderenta la celulele-gazda, iar superoxiddismutaza produsa de aceasta bacterie este o enzima considerata a fi implicata in protejarea celulelor impotriva neutrofilelor. O alta bacterie implicata in patologia periodontitei este *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, la care

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

adeziunea este mediata de mai mult decât de un mecanism, fapt dovedit de caracterul adeziv al tulpinilor nefimbriate *in vitro*.

Receptori de adezine. Integrine.

Rolul receptorilor celulari a fost demonstrat de Sellwood si colab. (1975). S-a observat ca sensibilitatea omului si a animalelor la tulpini entero- si uropatogene de *E. coli* este corelata cu un numar mare de receptori specifici de pe membrana epiteliilor respective. Rezultatele cercetarilor au dovedit ca procesele de adeziune si invazie necesita interactiunea specifica dintre adezinele agentilor infectiosi si tinta lor = receptorii specifici de pe suprafata celulelor sensibile.

S-a observat, de asemenea, ca pe celulele infectate cu anumite virusuri pot aparea noi receptori de suprafata, absenti pe celulele normale. Fenomenul ar explica aparitia infectiilor secundare bacteriene postviroze (ca de exemplu, pneumonia bacteriana post-gripala). Astfel,o gazda normal rezistenta devine sensibila, putând lega diferite bacterii patogene si conditionat-patogene in cursul si ca urmare a infectiei virale.

Reactia *adezine / receptori* este bazata pe complementaritate stereochimica. Este general acceptat faptul ca celulele se recunosc una pe cealalta prin perechi de structuri complementare de pe suprafata lor: o structura de pe o celula poarta informatie biologica codificata, pe care structura de pe cealalta celula o poate descifra. Aceasta idee reprezinta o extindere a ipotezei lacat-cheie, formulata inca din 1897 de catre Emil Fisher (pentru interactiunea enzima-substrat), ipoteza care a devenit din 1920 una din teoriile centrale ale biologiei celulare (fig. 7).

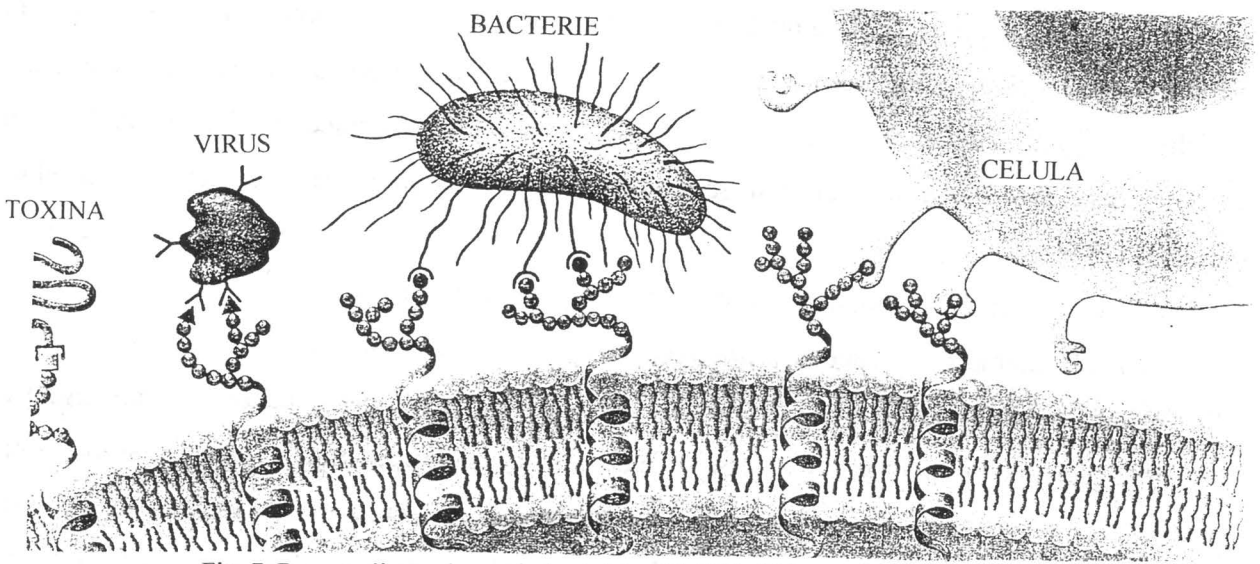


Fig. 7. Receptorii membranari ai celulelor Ek (GP, GL) servesc ca puncte de atasare pentru alte celule, bacterii, virusuri, toxine s.a.

Aceasta reactie este uneori riguros specifica, iar in alte cazuri este total nespecifica, o anumita bacterie putând infecta celule eucariote de proveniente foarte diferite, care au modalitati

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

comune de legare si internalizare. Astfel, s-a demonstrat ca *Salmonella sp., Yersinia sp.* etc. pot infecta la fel de eficient celulele intestinale umane si liniile celulare embrionare de *Drosophila.* In schimb, *Streptococcus pyogenes* se localizeaza frecvent in faringe si rar in caile urinare, iar *E. coli* colonizeaza frecvent epiteliul intestinal si al cailor urinare si foarte rar pe cel respirator. Bacteria *Neisseria gonorrhoeae* este un alt exemplu de infectiozitate cu specificitate de tesut, in sensul ca adera la celulele umane ale epiteliului genital si oral, dar nu si la celulele altor organe sau altor specii animale. Acest fapt explica de ce omul este gazda exclusiva pentru *N. gonorrhoeae*, alte mamifere neputând contracta gonoreea. Prin acest mecanism, distributia receptorilor celulari si diferentele de specificitate explica tropismul diferit al microorganismele patogene, care se pot lega exclusiv sau preferential de anumite celule si niciodata de altele.

Prezenta receptorilor complementari nu echivaleaza intotdeauna cu capacitatea bacteriilor de a coloniza tesutul, ceea ce sugereaza ca procesul de aderenta implica si corecta prezentare, orientare si accesibilitatea adezinelor si receptorilor. Pentru a adera, viabilitatea celulelor nu este obligatorie. Astfel, s-a realizat inhibarea capacitatii de aderenta si invazie a unor bacterii enteroinvazive (*E. coli* enteropatogena, *Salmonella typhimurium*) la celule intestinale umane cultivate *in vitro*, prin preaderarea unor celule de *Lactobacillus acidophilus,* viabile sau omorâte prin caldura. Experimentul a demonstrat ca odata ocupate situsurile de atasare de catre lactobacili, acestea nu mai sunt disponibile pentru aderenta enteropatogenilor.

Au fost identificate cinci familii structurale principale de molecule de adeziune : *integrinele, selectinele, proteine din superfamilia imunoglobulinelor, mucinele* si *cadherinele.*

Integrinele formeaza o superfamilie de receptori inruditi, având o varietate de functii necesare pentru atasarea celulei eucariote de proteinele de matrice extracelulara, fagocite si pentru aderenta celulara in general. Aceste molecule de adeziune - integrinele mediaza recunoasterea intercelulara, importanta pentru diferite procese biologice, incluzând morfogeneza embrionului, procesul de vindecare si raspunsul imun.

Pentru a apara organismul impotriva agentilor infectiosi, celulele sistemului imunitar trebuie sa fie capabile sa circule ca celule neaderente in sânge si limfa si de a migra ca celule aderente spre tesuturile infectate. Pentru a controla aceasta tranzitie rapida intre starea aderenta-neaderenta, leucocitele sunt echipate cu diferiti receptori de adeziune. O familie a acestor molecule, **selectinele** sunt importante in dirijarea traficului leucocitelor, localizarea in tesuturi si recrutarea lor in zonele inflamate. Functia majora a selectinelor este de a regla interactiunile dintre leucocite si celulele vasculare endoteliale, care constituie pasul initial si reglator al miscarii leucocitelor in organele limfoide si nelimfoide.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

O alta familie de molecule de adeziune o formeaza **cadherinele**, implicate in agregarea homotipica – Ca^{2+} dependenta a celulelor nelimfoide ; are rol structural in jonctiunile intercelulare si este receptor specific pentru proteina *internalina* din membrana externa a bacteriei *Listeria monocytogenes*, facilitând aderenta acesteia la celulele intestinale.

Integrinele leaga mai multe tipuri de proteine prezente in sânge si in matricea extracelulara, incluzând fibronectinele, fibrinogenul, vibronectinele, laminina, colagenul tip I, osteopontina, precum si *adezinele microorganismelor patogene*. Structura generala a integrinelor este aceea a unui heterodimer alcatuit din douã subunitati polipeptidice denumite α si β, modelul lor general de structura incluzând un domeniu extracelular, un domeniu transmembranar si unul intracitoplasmatic, corespunzând extremitatilor -COOH terminale. Cele doua domenii extracelulare participa la interactiunea cu ligandul, in prezenta ionilor de Ca^{2+} si Mg^{2+}. Modul de legare a diferitelor proteine de integrina - receptor a fost inteles din momentul in care s-a demonstrat ca toate proteinele cu care interactioneaza au in structura lor una sau mai multe secvente **[Arg-Gly-Asp (RGD)],** conservate de-a lungul evolutiei si care actioneaza ca secvente-semnal de recunoastere. Desi secventa de legare (RGD) este aceeasi la diferitele proteine de adeziune, celulele eucariote, prin integrinele lor, le pot recunoaste individual specificitatea, deoarece in fiecare caz, orientarea spatiala a resturilor de (Arg-Gly-Asp) este unica si caracteristica. In felul acesta, fiecare integrina recunoaste un anumit ligand care contine o secventa (RGD) sau un numar limitat de liganzi. Sistemul de adeziune bazat pe secventa RGD are un rol important in relatia parazit-gazda; microorganismele poarta pe suprafata lor structuri care mimeaza ca specificitate integrinele celulei-gazda, ceea ce demonstreaza ca in cursul evolutiei, parazitii au dezvoltat aceste structuri complementare proteinelor de suprafata (receptori preexistenti) ale celulelor, care le favorizeaza aderarea si patrunderea in celulele gazdei.

Din categoria integrinelor fac parte si proteinele receptor de complement [PrMac-1(CR_3), s.a.], care participa la inglobarea in fagocite a mai multor patogeni (*Legionella pneumophila, Mycobacterium tuberculosis, Leishmania donovani* etc.). Capacitatea de a utiliza integrinele nu este limitata la bacteriile parazite intracelular. Astfel, *Bordetella pertussis* (agent patogen al tusei convulsive) contine o proteina de suprafata - *hemaglutinina filamentoasa (FHA)*, care are functie de adezina. Ea are in structura sa secventa RGD, care îi permite sa interactioneze cu o integrina de pe epiteliul ciliat al cailor respiratorii umane, favorizând colonizarea acestuia.

Fibronectinele (FN), numite si *proteine de reglare celulara* sau *factorul de adeziune celulara,* formeaza o clasa de glicoproteine macromoleculare (g.m. 220 kDa) multifunctionale.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Sunt prezente in forma solubila in sânge (~ 20 μg/ml) si in forma insolubila in tesuturi (matricea extracelulara). Molecula de FN consta din domenii inalt structurate ce contin situsuri de legare pentru macromoleculele cu care interactioneaza. Situsul de legare cu celulele de mamifere are in structura sa secventa (RGD). FN plasmatica este produsa de hepatocite, de macrofage si de celulele endoteliale. Au functia esentiala de a asigura aderarea de celulele de mamifer si o mare afinitate pentru colagen, fibrinogen, fibrina, proteoglicani, pentru suprafata celulelor eucariote, dar si pentru cele bacteriene, glicoproteinele virale, adezinele protozoarelor parazite etc. Dintre numeroasele exemple studiate, privind rolul FN in aderenta bacteriilor patogene, cel mai cunoscut si complex in acelasi timp este cel al bacteriei *Streptococcus pyogenes*, frecvent prezenta in orofaringe si pe mucoasa cailor respiratorii superioare. Eliminata in aer prin picaturile de saliva, bacteria poate afecta un alt organism numai daca adera de suprafata mucoaselor acestuia si le colonizeaza prin multiplicare.

Mecanismul fenomenului de aderenta de mucoase este explicat prin formarea unor punti care implica participarea fibronectinelor, a acizilor lipoteichoici si a proteinei M din structura peretelui celular al streptococilor, datorita interactiunii dintre poli, de o parte – glicerofosfati, iar de cealalta parte - resturile de lizina din proteine. Aceasta interactiune are drept consecinta expunerea in mediu a extremitatii hidrofobe a acidului lipoteichoic, care se leaga de situsuri complementare din structura FN, respectiv spre extremitatea NH_2 terminala a acesteia. Extremitatea -COOH a fibronectinei se leaga de suprafata celulei epiteliale realizând astfel o "punte" bimoleculara (acid lipoteichoic-fibronectina), care fixeaza bacteria de mucoasa (fig. 8). Proteina M actioneaza ca un mecanism aditional, având o activitate similara lectinelor si utilizând ca receptor fucoza sau galactoza de pe suprafata celulelor faringeale. In functie de natura celulei de care este legata, efectul asupra bacteriei este diferit. Când functia adeziva leaga bacteria de granulocitele neutrofile, efectul este opsonizant si are drept urmare fagocitarea bacteriei si distrugerea ei. Când bacteria este legata de fibronectina tisulara, ea furnizeaza o modalitate de legare care contribuie eficient la virulenta bacteriei.

Pot fi date si alte exemple de bacterii care se leaga de proteinele matricei extracelulare, care mediaza astfel adeziunea bacteriana la tesuturile-gazda: *Treponema pallidum* se leaga de o secventa RGD a fibronectinei, *Yersinia enterocolitica* se ataseaza in special de fibronectine, *Toxoplasma gondii* si *Streptococcus gordonii* leaga laminina, *Staphylococcus saprophyticus*, un agent cauzal important al infectiilor tractului urinar, leaga FN si laminina.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

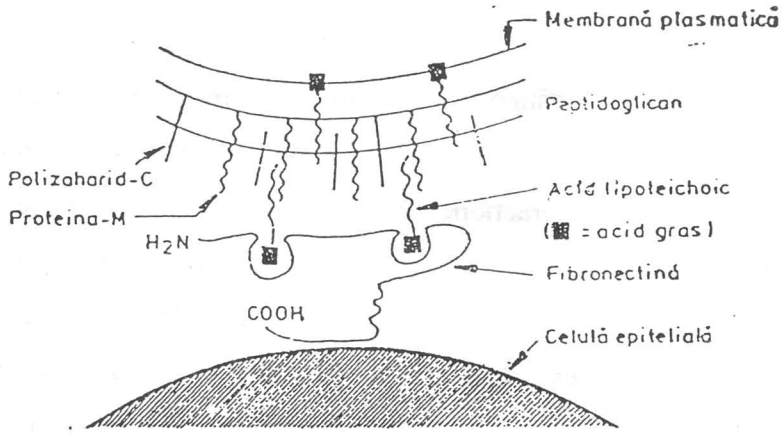


Fig. 8. Aderenta la celula-gazda a bacteriei *Streptococcus pyogenes* se realizeaza printr-o punte de fibronectina (FN). Moleculele de acizi lipoteichoici secretate de catre bacterii se leaga cu extremitatea hidrofila de proteina M, iar cu cea hidrofoba de situsuri complementare de pe molecula de FN, al carei capat carboxiterminal se leaga puternic de celulele epiteliale. Rezulta o aderenta nespecifica a streptococilor la celulele epiteliale, printr-o punte de FN.

Semnificatia medicala a biofilmelor microbiene.

De la primele observatii asupra procesului de aderenta bacteriana, urmate de recunoasterea ubicuitatii bacteriilor aderate, s-au facut progrese in intelegerea fiziologiei microorganismelor sesile si a devenit clar ca bacteriile crescute in biofilme reprezinta o faza de crestere distincta, o forma de diferentiere a bacteriilor care sunt profund diferite de faza de crestere planctonica studiata atât de asiduu in timpul celor 150 de ani care au urmat descoperirilor lui Pasteur.

Descoperirea cea mai importanta a ultimilor ani este aceea ca bacteriile aderente sunt fenotipic profund diferite de bacteriile aflate in suspensie. Modificarile cele mai semnificative se pare ca se produc la nivelul invelisului celular si al sistemelor de transport. Relativ recent s-a descoperit ca adeziunea determina exprimarea unui factor σ care derepreseaza un mare numar de gene, asa incât celulele biofilmului sunt net diferite din punct de vedere fenotipic, de celulele libere in suspensie. Fiecare bacterie din biofilm traieste intr-o micronisa , intr-o comunitate microbiana complexa care are o <<homeostazie>> primitiva, <<un sistem circulator>> primitiv si o cooperare metabolica care fac ca fiecare din aceste celule sesile sa reactioneze la mediul sau special, asa incât difera fundamental de o celula planctonica din aceeasi specie.

Una din consecintele formarii biofilmelor cu implicatii medicale, este aceea ca microorganismele componente sunt mult mai rezistente la substante antimicrobiene, ca si la mecanismele imunitare ale gazdei. Ipotezele actuale privind cauzele rezistentei celulelor incluse in biofime sunt urmatoarele:

- agregarea bacteriilor intre ele;
- enzimele degradative, fie in concentratii mari, fie printr-o activitate concertata, sinergica a celor provenind de la specii diferite din structura biofilmului;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- exopolimerii secretati care protejeaza celulele; aceasta ipoteza formulata adesea in trecut, conform careia substantele mucoide ar constitui o bariera de difuzie fata de moleculele antimicrobiene, este respinsa azi de catre unii autori;
- cea mai recenta dintre ipotezele formulate, considera ca adeziunea celulara determina modificari fiziologice care explica fenomenul de rezistenta a microorganismelor din biofilm; s-a demonstrat pe *E. coli* la celulele imobilizate intr-un gel de agar (simulare a unui biofilm) o subexprimare a porinei Omp F , ceea ce ar explica rezistenta la antibiotice, pentru ca majoritatea antibioticelor hidrofile trebuie sa treaca prin aceasta porina pentru a penetra in spatiul periplasmic al celulelor.

Desi corpul uman are mecanisme de aparare si deseori se rezolva problema introducerii unui numar mare de bacterii libere (10^6 celule) in organele sterile (inima, plamân, peritoneu), mult mai putine (10^3) celule sesile pot cauza infectii persistente in aceleasi organe. In timp ce bacteriile libere care cauzeaza infectii bacteriene acute diseminate sunt uzual controlate de dozele conventionale de antibiotice, bacteriile din biofilme determina infectii cronice rezistente la chemoterapia cu antibiotice. Semnificatia medicala a acestui proces este legata in special de utilizarea in medicina, in diferite scopuri, a biopolimerilor, a caror suprafata poate fi colonizata de bacterii, generatoare a unor infectii asociate utilizarii materialelor protetice. Multe corpuri straine (catetere intravasculare, sonde gastrice si urinare, tuburi de drenaj) si biofilmele bacteriene aderente pot fi indepartate inainte de aparitia infectiei cronice. Daca bacteriile din biofilmele formate au capacitatea de a persista, agregate mari de celule prinse intr-o matrice de glicocalix se pot detasa. Când agregatele bacteriene s-au detasat dintr-un *pace-maker* cardiac implantat pacientilor, celulele grupate in mase mari ajunse in capilarele inguste ale plamânilor si creierului pot produce pneumonie sau congestii.

Deoarece biofilmele protejeaza bacteriile de mecanismele de aparare ale gazdei asa de eficient, trebuie sa fie folosita o stratagema foarte adecvata pentru a evita introducerea biofilmelor in organele sterile. Personalul medical trebuie sa se asigure ca biofilmele din apa, aer, sistem respirator artificial nu se raspândesc in sistemul pulmonar al bolnavilor, generând infectii nosocomiale. Chirurgii trebuie sa se convinga ca nu se implanteaza biofilme cu bacterii vii odata cu materialele straine si ca tesuturile moarte si degradate au fost riguros indepartate. Orice material steril nu trebuie sa poarte reziduuri de biofilme omorâte prin sterilizare, deoarece aceste excrescente duc la accelerarea dezvoltarii secundare a biofilmelor de catre microorganismele libere. O modalitate de preveni infectarea cateterelor este aceea de a depista bolnavii purtatori ai unor tulpini de stafilococi (*S. epidermidis*, producator de biofilme) la nivelul pielii, caci o astfel de colonizare ar putea conduce la dezvoltarea unei infectii legate de cateter. Alte masuri preconizate pentru reducerea incidentei infectiilor asociate cateterelor, includ

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

utilizarea unor lubrifianti ai cateterelor care sa contina agenti antimicrobieni sau chiar a unor catetere impregnate cu agenti antimicrobieni, cum ar fi sarurile de argint.

Procesul de aderenta are efecte care pot fi traduse prin persistenta bacteriilor pe dispozitivele medicale, ca si pe tevile de apa contaminate cu bacterii, chiar atunci când sangele si apa contin suficiente antibiotice, respectiv clor pentru a omorî micropopulatia de celule aflate in stare libera. Apar probleme majore in contextul sanatatii publice, care privesc distributia apei potabile prin conducte pe care se formeaza biofilme de enterobacterii care elibereaza periodic celule, recontaminând apa si sistemele de distributie. In sistemele de distributie a apei, in special in statiile hidrotermice unde apa nu este clorinata si unde se formeaza aerosoli inhalabili (sisteme de aer conditionat, dusuri cu apa fierbinte) poate fi prezenta in biofilme si bacteria *Legionella pneumophila*, agentul patogen al "bolii legionarilor", dotat cu o mare capacitate de aderenta la metale si considerat factor de *biohazard infections* (generator de infectii grave).

De asemenea, suprafetele liniilor de producere si ambalare a alimentelor sunt contaminate de biofilme dificil de eliminat si care pot constitui rezervoare de bacterii potential patogene (enterobacterii, *Listeria sp*).

Bacteriile care s-au adaptat ca membri functionali ai biofilmelor redevin sensibile la substantele antimicrobiene, când se disperseaza pentru a coloniza noi spatii. Aceasta etapa este adesea foarte precis determinata temporal si ofera o oportunitate pentru un control antimicrobian eficient. Când celulele se ataseaza si formeaza din nou bioagregate, microhabitatul anaerob le protejeaza de agentii antioxidanti.

Când biofilmele din infectiile cronice s-au dezvoltat, introduse sau nu cu implanturile sau organele transplantate, chemoterapia trebuie sa se bazeze pe doze de antibiotice necesare omorârii bacteriilor din biofilme si nu pe cele care pot ucide celulele libere, determinate prin testele de rutina de testare a sensibilitatii bacteriene la antibiotice. Toate antibioticele de pe piata au fost testate si selectate pentru abilitatea lor de a ucide bacteriile planctonice. Industria farmaceutica este preocupata in prezent de programele de dezvoltare a agentilor de penetrare a biofilmelor prin studiul acestora in relatie cu substratul lor natural, sub forma de biofilme sau de microcolonii si care sa fie scaldate de un mediu care sa-l aproximeze pe cel natural.

Implantarea si dezvoltarea unui biofilm, incepând cu aderenta celulelor bacteriene sunt procese programate de catre genomul bacteriilor care se fixeaza, o mare parte din gene (40%) fiind implicate in aceasta noua programare. Cunoasterea acestor procese in toata complexitatea lor ar putea permite crearea de noi instrumente moleculare pentru a lupta impotriva biofilmelor nedorite.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Toxinogeneza

Toxinogeneza rezida in capacitatea unor microorganisme patogene de a produce in cursul metabolismului una sau mai multe substante toxice. Descoperirea capacitatii toxigenice i se datoreaza lui Loffler (1884) care, dupa inocularea la soareci de bacili difterici *(Corynebacterium diphteriae),* a observat aparitia de leziuni in tesuturi indepartate de locul inocularii, deoarece bacteriile se multiplica la poarta de intrare, de unde difuzeaza in organism o substanta cu efect toxic. Uneori bacteriile nu produc neaparat o toxina, dar efectele se datoreaza altor produsi de metabolism sau efectiv cresterii numarului de bacterii. Toxinele sunt otravuri microbiene care afecteaza profund initierea si evolutia unei infectii, deoarece o singura toxina poate face ca un microorganism sa fie virulent.

Toxinele bacteriene produse *in vitro* pot fi injectate la animale si reproduc manifestarile patologice ale infectiei si efecte letale. Nu numai bacteriile patogene produc toxine, ci si bacteriile saprotrofe (*Clostridium botulinum*).

Pentru ca efectul toxic sa se produca, toxinele trebuie sa fie eliberate din celule si sa fie solubile in umorile organismului. Dupa ce toxinele sunt sintetizate in celulele bacteriene, pot fi eliberate din celule in mediul extracelular sau ramân in celulele bacteriene, fiind eliminate dupa autoliza acestora, astfel ca se clasifica in **exotoxine** si **endotoxine**. Dupa compozitia chimica, toxinele pot fi de natura proteica (exotoxine) sau lipoproteica, lipopolizaharidice (endotoxine). Principalele caracteristici ale acestor categorii de toxine bacteriene sunt prezentate in tabelul nr.3

Tabel nr. 3. Trasaturile principale prezentate comparativ ale exotoxinelor si endotoxinelor bacteriene.

Proprietatea	**Exotoxine**	**Endotoxine**
Sursa	Anumite specii ale bacteriilor Gram pozitive si Gram negative	Peretele celular al majoritatii bacteriilor Gram negative
Secretate de celule	Da	Nu
Structura chimica	Polipeptide	Lipopolizaharide
Localizarea genelor	Plasmide sau bacteriofagi	Cromosomul bacterian
Toxicitate	Mare (doza letala este de ordinul a 1µg)	Redusa (doza letala este de ordinul a sute de µg)
Efecte clinice	Diferite efecte	Febra, stare de soc
Modul de actiune	Diferite moduri	Prin intermediul TNF si interleukina-1
Antigenitate	Induc titruri mari de anticorpi numiti antitoxine	Slab antigenice
Vaccinuri	Pot fi transformate in toxoizi (anatoxine), folositi ca vaccinuri	Nu pot fi transformate in toxoizi si nu exista alte vaccinuri disponibile
Termostabilitate	Distruse rapid la 60°C (cu exceptia enterotoxinei stafilococice)	Stabile la 100°C timp de 1h
Boli tipice	Tetanos, botulism, difterie etc.	Meningococemie, infectii cu bacili Gram negativi

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Exotoxinele sunt eliberate in mediu (gr. *exo* = in afara), se dizolva in sânge si circula in organism, ajungând la situsul lor de actiune, ceea ce determina aparitia manifestarilor caracteristice bolii. Sunt produse in cea mai mare parte de catre bacteriile patogene Gram pozitive, desi si unele bacterii Gram negative au aceasta capacitate, cum ar fi: *Vibrio cholerae, Shigella dysenteriae, Pseudomonas aeruginosa.*

Exotoxinele sunt produse *in vivo* la locul multiplicarii bacteriilor si transportate la distanta, exercitându-si efectul asupra tesuturilor sensibile ale organismului gazda. Eliberarea din celulele producatoare are loc in faza de multiplicare activa a celulelor, iar concentratia lor in mediu este maxima când cresterea bacteriana a atins punctul maxim. Pot ramâne partial legate de corpii celulari (de ex. la *Corynebacterium diphteriae, Clostridium botulinum* toxina este eliberata total doar dupa liza celulelor). Toxicitatea se apreciaza prin DL50 (Doza letala 50). De exemplu :

DL50 = 0,002 ml filtrat de toxina difterica ;
= 0,005 ml '' '' tetanica ;
= 0,0001 ml '' '' botulinica ;

Toxinele purificate au o toxicitate mult mai mare, comparativ cu cea a filtratelor culturilor. Deoarece exotoxinele sunt proteine, moleculele lor sunt sensibile la caldura si la substante chimice care reactioneaza in mod normal cu proteinele. De exemplu, toxinele supuse actiunii formaldehidei isi pierd toxicitatea, transformându-se in *anatoxine* sau *toxoizi* care îsi pastreaza insa capacitatea de a declansa un raspuns imun daca sunt introduse intr-un organism imunocompetent. Exploatarea acestor proprietati conduce la obtinerea anatoxinelor difterica si tetanica utilizate in imunizarea activa antidifterica si respectiv antitetanica. Sunt sensibile la pH acid si pot fi neutralizate de anticorpi specifici. Fiind de natura proteica, multe pot fi inactivate sau chiar distruse de enzimele proteolitice intestinale. Face exceptie toxina botulinica, a carei toxicitate se intensifica dupa o proteoliza limitata, prin expunerea unor grupari de toxicitate anterior mascate.

Din punct de vedere structural sunt similare hormonilor glicoproteici, fiind alcatuite din 2 subunitati polipeptidice A si B, una având activitate biologica, cealalta mediind legarea moleculelor toxinei de celulele sensibile. Uneori, in forma nativa au structura unui singur lant, dar in timpul eliminarii din celula producatoare sau in mediul extracelular, sub actiunea unor enzime bacteriene sau ale gazdei (proteaze), lantul initial este scindat in cele doua lanturi. Efectul toxic se poate manifesta fie la nivelul membranei celulelor sensibile (fosfolipaze, hemolizine, lizine care degradeaza lipidele membranare), fie la nivelul unor ţinte intracelulare.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Pentru a-si exercita efectul biologic, toxinele trebuie sa se lege de receptori celulari, dupa care sunt internalizate si actioneaza la nivelul tintei intracelulare.

In cazul mai multor boli de etiologie bacterieana, semnele si simptomele acestora sunt efectele toxinelor elaborate de agentii lor cauzali. In tabelul nr. 4 sunt prezentate patogenitatea si modul de actiune ale celor mai importante exotoxine, eliberate atât de bacterii Gram pozitive, cât si de bacterii Gram negative.

Tabel nr. 4. Patogenitatea si modul de actiune ale celor mai importante exotoxine.

Specii bacteriene	**Boala**	**Modul de actiune**	**Vaccin disponibil de tip toxoid**
Gram pozitive			
Corynebacterium diphteriae	Difterie	Inactiveaza EF-2 prin ADP-ribozilare	Da
Clostridium tetani	Tetanos	Blocheaza eliberarea glicinei - neurotransmitator inhibitor	Da
C. botulinum	Botulism	Blocheaza eliberarea acetilcolinei	Da
C. difficile	Colita pseudo-membranoasa	Exotoxina B este toxica pentru enterocite	Nu
C. perfringens	Gangrena gazoasa	Alfa toxina este o lecitinaza. Enterotoxina este un superantigen	Nu
Bacillus anthracis	Antrax	Una dintre toxine este o adenilat ciclaza	Nu
Staphylococcus aureus	Soc toxic	Toxina este un superantigen; se leaga de moleculele CMH clasa II si de receptorul T celular (TCR); induce sinteza IL-1 si IL-2	Nu
Streptococcus pyogenes	Scarlatina	Este un superantigen; actioneaza similar toxinei TSST-1 produsa de *S. aureus*	Nu
Gram negative			
Escherichia coli	1. Diaree apoasa 2. Diaree sanguinolenta	Toxina labila stimuleaza adenilat ciclaza prin ADP-ribozilare; toxina stabila stimuleaza guanilat ciclaza. Verotoxina este citotoxica pentru enterocite	Nu Nu
Vibrio cholerae	Holera	Stimuleaza adenilat ciclaza prin ADP-ribozilare	Nu
Bordetella pertussis	Tuse convulsiva	Stimuleaza adenilat ciclaza prin ADP-ribozilare; inhiba chemokin-receptorul	Da

Tetanosul este datorat efectelor sistemice ale *tetanospasminei*, toxina codificata de o plasmida. Toxina este produsa si eliberata prin liza celulelor de *Clostridium tetani* dupa cresterea in conditii anaerobe, atât *in vitro* cât si *in vivo*, cum ar fi de exemplu in rani profunde produse prin intepare. Toxina este produsa initial ca un singur lant polipeptidic de 160 kDa. La eliberarea din celula bacteriana, peptidul este clivat de enzime proteolitice in doua lanturi polipeptidice,

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

conectate de o punte disulfidica (–S-S-). In conditii reducatoare, se desface aceasta legatura si rezulta doua lanturi : lantul greu (β) – de 107 kDa si lantul usor (α) – de 53 kDa. Situsul moleculei de toxina prin care se leaga de receptorii specifici este situat pe lantul β. Acest polipeptid se leaga de gangliozidele din membrana neuronului. Lantul α este internalizat si se deplaseaza de la nervii periferici spre sistemul nervos central (SNC). Lantul usor este o proteaza care degradeaza proteina responsabila de eliberarea neurotransmitatorilor inhibitori.

Mecanism de actiune al toxinei tetanice. Toxina tetanica este deci o neurotoxina care impiedica eliberarea neurotransmitatorilor inhibitori. Toxina eliberata la nivelul unei plagi periferice, poate circula fie prin transport axonal retrograd, fie prin torentul circulator, la cornul anterior si neuronii interstitiali ai maduvei spinarii. La nivelul SNC (maduva spinarii, cerebel), tetanospasmina se leaga repede de receptorul specific, o gangliozida care contine acid stearic, sfingozina, glucoza, galactoza, N-acetilglucozamina si acid N-acetilneuraminic (acid sialic).

Efectul spasmogen al toximei se datoreaza actiunii sale asupra componentelor presinaptice ale arcurilor reflexe din maduva spinarii. Toxina blocheaza inhibitia normala postsinaptica a neuronilor spinali motori, care urmeaza dupa impulsurile aferente, prin prevenirea eliberarii neurotransmitatorilor inhibitori (acid γ- aminobutiric, glicina). Blocarea eliberarii acestor neurotransmitatori conduce la o sensibilitate mare la impulsurile excitatorii, necontrolate de mecanismele inhibitorii si la contractii spastice ale muschilor voluntari (scheletici), exemplificate cel mai bine de spasmul muschilor maxilarelor, gâtului si paralizie spastica generalizata, caracteristica tetanosului.

Botulismul este o intoxicatie alimentara, consecinta a ingerarii toxinelor produse de *Clostridium botulinum,* care se dezvolta in alimente, principalele vehicule fiind fructele si legumele conservate incorect (de obicei pregatite in casa), condimente si produse de peste.

Contaminarea plagilor cu agentul patogen determina o infectie neinvaziva si formarea de toxina, care caracterizeaza *botulismul de ranire*.

C. botulinum poate de asemenea sa colonizeze tractul intestinal al copiilor si sa produca toxina *in situ* , ceea ce conduce la starea de *botulism infantil.*

Toxina se acumuleaza in celulele bacteriene in timpul germinarii sporilor si cresterii active a celulelor vegetative, dar este eliberata numai dupa liza celulelor. Fiecare din cele 7 tipuri serologice de *C. botulinum* (A, B, C-α, D, E, F, G) produce câte o toxina specifica de tip. Unele sunt codificate de o plasmida, altele de un bacteriofag temperat si altele de gene cromozomale.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

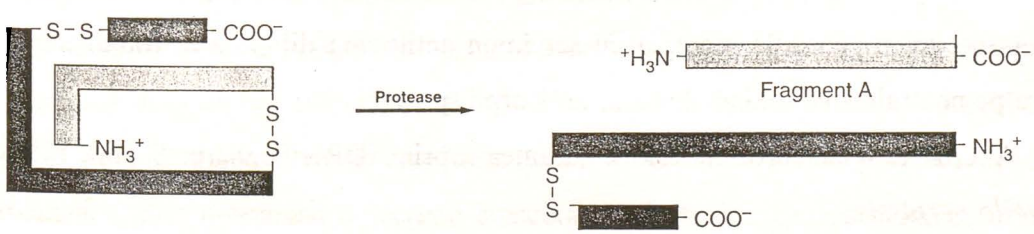
Toxinele produse de serotipurile A, B, E si F afecteaza omul. Toxinele botulinice sunt produse ca o proteina progenitor cu g.m. ~ 150 kDa, ca molecule inerte care devin active dupa proteoliza, dar clivajul proteic are loc la nivelul unor situsuri localizate intern in moleculele peptidice, astfel ca toxina nu isi schimba greutatea moleculara dupa activare.

Toxina este compusa din doua polipeptide mentinute impreuna de o punte disulfidica. Una din subunitati se leaga de un receptor de pe suprafata neuronului; cealalta subunitate este o proteaza care degradeaza proteinele responsabile de eliberarea acetilcolinei. Exista 6 serotipuri de toxina botulinica (A-F).

Mecanism de actiune al toxinei botulinice. Toxina botulinica este o neurotoxina care blocheaza eliberarea acetilcolinei la nivelul sinapselor , determinând o paralizie flasca. Este unul dintre cei mai toxici compusi de natura biologica cunoscuti. Dupa absorbtia la nivelul tractului gastrointestinal, toxina ajunge pe cale sanguina la neuronii senzitivi (la jonctiunile neuromusculare si sinapsele periferice autonome), unde se leaga de componentele presinaptice, blocând eliberarea acetilcolinei din terminatiile nervoase motoare colinergice. Simptome : slabiciune, tulburari de echilibru, greata, tulburari de vedere si de vorbire, dilatarea pupilelor, retentie urinara, paralizie generalizata flasca a muschilor scheletici si paralizia muschilor respiratori.

Difteria. Toxina produsa de *Corynebacterium diphtheriae*, agentul patogen al difteriei, este codificata de gena structurala *tox,* parte a unui genom fagic (corinefagul β). Doar tulpinile lizogene de bacil difteric sunt producatoare de toxina difterica. Toxina este secretata sub forma unui peptid unic, cu g.m. 62.000 Da. Prin proteoliza blânda, peptidul unic este scindat in doua lanturi majore A si B, conectate prin punti disulfidice (fig. 9).

Fig. 9 . Structura si mecanismul de activare al exotoxinei difterice; toxina extracelulara intacta se leaga de celula eucariota prin intermediul fragmentului B, iar dupa clivajul proteolitic si reducerea legaturii disulfidice, fragmentul A care contine enzima de ribozilare este activat.



Fragment A Fragment B

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Mecanismul de actiune al toxinei difterice. Peptidul A contine situsul activ al enzimei, cu efect de inhibare a proteosintezei. Peptidul B este responsabil pentru legarea moleculelor de toxina de receptorul lor specific situat pe celulelor epiteliale ale tractului respirator superior. La legarea de celulele –tinta, puntile disulfidice sunt reduse si peptidul A (g.m. = 22 kDa) intra in celula. Acest fragmentul A de la capatul NH2 – terminal al exotoxinei este o enzima care catalizeaza transferul ADP-ribozei de la NAD (nicotinamid adenin-dinucleotid) la EF-2, dupa reactia:

EF-2 + NAD ⇒ EF-2- ADP-riboza + Nicotinamida

Inhibarea proteosintezei este un efect al adenoribozilarii si inactivarii consecutive sub actiunea peptidului A, a factorului de elongatie – 2 (EF - 2), enzima necesara pentru translocarea polipeptidil – ARNt, de la situsul acceptor la situsul donor al ribozomilor de tip eucariot. Prin ADP-ribozilarea acestui factor EF-2 si inactivarea sa consecutiva, este blocata translocatia si procesul de proteosinteza inceteaza. Activitatea enzimatica a toxinei difterice (fragmentul A) este specifica pentru acest factor. Specificitatea se datoreaza prezentei in EF-2 a unui aminoacid unic, o histidina modificata, numita *diftamida*. Reactia are loc in toate celulele eucariote, fara specificitate de tesut sau organ. In celulele procariote si la nivelul mitocondriilor proteosinteza nu este afectata, deoarece este implicat un factor de elongatie diferit, insensibil. Actiunea enzimei este foarte puternica, astfel ca o singura molecula de fragment A poate omorî o celula in câteva ore.

Fragmentul B , un peptid cu g.m. 40.000 Da, de la capatul COOH-terminal se leaga de receptorii de pe membrana celulelor eucariote si mediaza transportul transmembranar al fragmentului A in celule, unde are loc proteoliza localizata si reducerea puntii disulfidice, cu elibereaza fragmentul A, care are activitate enzimatica ce conduce la inactivarea EF-2.

Celulele moarte si dezintegrate se acumuleaza, impreuna cu mucus, bacterii, leucocite, material fibros, si determina blocarea cailor respiratorii.

Toxoidul obtinut din toxina difterica nu poate fi clivat in subunitatile A si B, deci toxoidului îi lipseste capacitatea de a cataliza efectele sale toxice intracelulare, dar isi pastreaza proprietatile imunogene. Seroterapia cu ser imun antitoxina difterica in tratamentul difteriei, se bazeaza pe neutralizarea toxinei de catre anticorpii specifici.

Alte bacterii ale caror exotoxine actioneaza prin ADP–ribozilare: *E. coli, Vibrio cholerae, Bordetella pertussis.*

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Celule de *C. diphteriae* nelizogene pot fi prezente in microbiota orofaringelui persoanelor sanatoase, insa doar tulpinile de *C. diphteriae* lizogenizate de un bacteriofag temperat pot fi agenti cauzali ai difteriei. Sinteza exotoxinei la tulpinile lizogene este controlata prin interactiunea fierului din mediu cu represorul genei *tox,* sintetizat de bacterie. La cresterea concentratiei de Fe, represorul inhiba transcrierea genei *tox.*

Toxina difterica este absorbita in vasele limfatice si sanguine si exercita câteva efecte si semne clinice :

- Stare generala proasta, cu febra, paloare, epuizare ;
- Miocardita, de obicei in primele 2 saptamâni, modificari electrocardiografice si posibil stop cardiac ; daca infectia nu are sfârsit letal, de obicei vindecarea este completa ;
- Polinevrita, care poate surveni dupa boala ca rezultat al demielinizarii ; aceasta poate afecta, de ex., perechea a IX-a de nervi cranieni, având ca efect paralizia palatului moale si regurgitarea lichidelor.

Gangrena gazoasa. *C. perfringens* si alte specii de clostridii produc numeroase toxine care determina gangrena gazoasa. Un total de sapte factori letali si cinci enzime au fost caracterizate, dar nici o specie de *Clostridium* nu produce toti cei 12 metaboliti. Cel mai bine caracterizata este **α- toxina** care este o lecitinaza care hidrolizeaza lecitina din membrana celulara, determinând distrugerea membranei si moartea celulei. Celelalte patru enzime sunt colagenaza, proteaza, hialuronidaza si DN-aza. Cele sapte toxine letale formeaza un grup heterogen cu activitate hemolitica si necrotica. Anumite tulpini de *C perfringens* produc o enterotoxina care determina diareea. Aceasta enterotoxina actioneaza ca un superantigen, similar enterotoxinei produsa de *S. aureus.*

C. difficile produce doua exotoxine, ambele fiind implicate in patogeneza colitei pseudomembranoase. Exotoxina A este o enterotoxina care determina diarea apoasa. Exotoxina B este o citotoxina cu efect asupra mucoasei colonului si determina formarea de pseudomembrane. Exotoxina B poate dezagrega filamentele de actina ale citoscheletului.

Holera este o boala infectioasa determinata de *Vibrio cholerae.* Se caracterizeaza prin semne si simptome de gastroenterita, prototip al sindroamelor diareice, fara ca agentul patogen sa fie invaziv. Tabloul clinic al bolii este determinat de o enterotoxina proteica produsa de tulpinile toxigenice, care determina o secretie crescuta de electroliti. Enterotoxina holerica are o

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

g.m. de 84 kDa, o subunitate B compusa din 5 monomeri identici (fiecare cu g.m. 11.500 Da) si o subunitate activa A (g.m. 27 kDa).

Modul de actiune al toxinei holerice. Toxina se leaga la receptorul glicoproteic GM_1 de pe membrana celulelor epiteliale intestinale si activeaza adenilat-ciclaza, ceea ce determina nivele crescute de AMPc si o hipersecretie de electroliti (Na+, K+, Cl-, HCO3-) si apa. Aceste modificari se manifesta clinic printr-o diaree cu aspect caracteristic holerei, numit "apa de orez".

Alte exotoxine sunt produse de stafilococi, streptococi, bacilul antraxului, bacilul pertussis. De exemplu, toxinele produse de *Staphylococcus aureus* produc leziuni ale membranelor celulare ale gazdei si pot avea o activitate generala sau foarte specifica:

Toxina α formeaza pori sau canale transmembranare la multe tipuri de celule. Canalele constau in inele hexamerice de unitati de toxina (34 kDa), care altereaza permeabilitatea celulei gazda, determinând citoliza. In functie de doza de toxina si calea de patrundere in gazda, aceasta toxina poate cauza fenomene de paralizie, neurotoxicitate, necroza si moarte. Este eliberata de bacteriile aflate in faza exponentiala de crestere. Exprimarea genei care codifica aceasta toxina, *hly,* se afla sub controlul genei *agr* (*accesory gene regulator*; este notata si *exp*), care controleaza exprimarea unui numar de proteine extracelulare, incluzând: toxina exfoliativa, TSST (*toxic shock syndrome toxin*), toxinele α, β si δ, enterotoxina b, lipaze si nucleaze.

Toxina β are o activitate mai restrictiva. Este o fosfolipaza care ataca sfingomielina din membrana celulara a eritrocitelor, macrofagelor si plachetelor sanguine. Exprimarea acestei toxine este controlata de prezenta unui bacteriofag in genomul stafilococilor. In acest proces sunt implicati doi fagi diferiti; se considera ca acestia stopeaza sinteza de toxina β, fie prin insertie in gena care codifica toxina, *hlb*, fie prin codificarea unor molecule represor ale acestei gene. Unul dintre acesti fagi contine o gena care codifica stafilokinaza; deci când gena pentru toxina β este inactiva (*switched off*), gena pentru stafilokinaza este activa (*switched on*).

Toxinele γ si δ sunt active de asemenea pe membranele celulelor gazda. Toxina γ este compusa din doua lanturi (de 32 si 36 kDa), dar mecanismul sau de actiune este necunoscut. Toxina δ este o molecula mult mai mica (3 kDa) care lizeaza mai multe tipuri de celule prin solubilizarea lipidelor membranare, intr-o maniera asemanatoare unui detergent.

Leucocidina este o toxina produsa de *S. aureus* activa in special asupra leucocitelor PMN si macrofagelor. Aceasta toxina are doua componente: F si S. Legarea componentului S de gangliozida GM_1, este urmata de legarea componentului F, ceea ce conduce la o crestere

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

ireversibila a activitatii enzimatice a acyl-fosfatazei membranare si la activarea fosfolipazei 2 a celulei gazda. Rezultanta finala este liza celulei gazda.

TSST. Toxina care determina sindromul de soc toxic - *Toxic Shock Syndrome Toxin* (*TSST*) este considerata un superantigen produs in primul rând de anumite tulpini de *Staphylococcus aureus* (dar si de anumite tulpini de *Streptococcus pyogenes*. Spre deosebire de antigenele obisnuite care activeaza una – câteva limfocite Th, TSST activeaza un mare numar de limfocite Th. Aceasta toxina se leaga direct de moleculele CMH clasa II, fara a mai fi internalizata si prelucrata. Acest complex interactioneaza cu lantul β al receptorului Tcelular (Vβ al TCR) al multor celule Th, determinând activarea lor si eliberarea consecutiva unor mari cantitati a IL-2, ca si a IL-1 din macrofage. Aceste interleukine sunt responsabile de multe dintre simptomele socului toxic. TSST este de asemenea un mitogen al limfocitelor T, ceea ce determina o supraproductie de citokine. Enterotoxina stafilococica, care determina toxiinfectie alimentara, are un mod similar de actiune, dar actioneaza local la nivelul tractului intestinal si cauzeaza voma si diaree.

Toxina eritrogena produsa de Streptococcus pyogenes, are un mecanism de actiune similar cu cel al TSST, actionând ca un superantigen. Genele care codifica aceasta toxina apartin unui bacteriofag temperat. Tulpinile bacteriene nelizogene nu pot determina scarlatina, dar pot fi agent cauzal al faringitelor si amigdalitelor.

Antraxul. *Bacillus anthracis* (agentul patogen al antraxului) produce o toxina cu trei componente: factorul "edem", antigenul protector si factorul letal. Factorul "edem" este o adenilat-ciclaza care necesita factor protector pentru a patrunde in celulele umane. Adenilat-ciclaza bacteriana creste concentratia de AMPc in celula, determinând pierderea ionilor de clor si a apei si aparitia edemului in tesuturi. Factorul letal este o proteaza care cliveaza o fosfokinaza necesara pentru transmiterea semnalului in calea care controleaza cresterea celulara. Pierderea fosfokinazei conduce la inhibarea cresterii celulare si moartea celulara consecutiva.

Tusea convulsiva. *PT (pertussis toxin)* – o toxina termolabila, care determina dermatonecroza la cobai si iepure. Aceasta toxina poate inhiba anumite functii fagocitare si poate contribui astfel la supravietuirea intracelulara a bacteriilor.

Mecanismele de actiune de baza ale exotoxinelor bacteriene sunt prezentate sintetic in tabelul nr. 5.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabel nr. 5. Mecanisme de actiune ale exotoxinelor bacteriene.

Mecanism de actiune	Exotoxina
ADP- ribozilare	Toxina difterica, toxina holerica, toxina termolabila produsa de *E. coli*, toxina pertussis
Superantigene	Toxina sindromului de soc toxic, enterotoxina stafilococica, toxina eritrogena streptococica
Proteaze	Toxina tetanica, toxina botulinica
Lecitinaza	α- toxina produsa de *C. perfringens*

*

Când toxinele sunt produse si actioneaza intr-un organism, pot manifesta *histotropism*; de ex. toxina botulinica este numita neurototoxina datorita actiunii sale asupra sistemului nervos, in timp ce toxina stafilococica este numita enterotoxina datorita actiunii sale asupra tractului gastrointestinal.

Organismul raspunde la exotoxine prin producerea unor anticorpi numiti antitoxine. Combinarea moleculelor de toxine cu antitoxinele are ca efect neutralizarea toxinelor. Terapia botulismului, tetanosului sau difteriei include seroterapia cu antitoxine. Prevenirea unor infectii cu bacterii Gram pozitive se bazeaza pe utilizarea anatoxinelor, ca vaccinuri eficiente

Deoarece exotoxinele sunt proteine, moleculele lor sunt sensibile la caldura si la substante chimice care reactioneaza in mod normal cu proteinele. De exemplu, toxinele supuse actiunii formaldehidei isi pierd toxicitatea, pastrându-si insa capacitatea de a declansa un raspuns imun daca sunt introduse intr-un organism imunocompetent.

Endotoxinele si lipopolizaharidele (LPS)

Componentul major al peretelui celular al bacteriilor Gram negative, lipopolizaharidele (LPS) sunt eliberate numai dupa dezintegrarea celulelor; sunt complexe lipo-polizaharid-proteice. Au o serie de activitati similare peptidoglicanului; de asemenea, pot avea efect letal. Nu stimuleaza raspunsul imun si nu pot fi transformate in toxoizi. LPS pot afecta orice raspuns inflamator sau alt mecanism de aparare al gazdei. Endotoxinele isi manifesta prezenta prin câteva simptome: febra, stare de slabiciune a organismului, dureri si stare generala alterata. In aceste conditii se pot instala tulburari ale sistemului circulator si starea de soc. Permeabilitatea vaselor de sânge se modifica, plasma se extravazeaza in spatiile intercelulare, tesuturile se tumefiaza, presiunea sanguina creste si pacientul poate intra in coma. Aceasta conditie, numita **soc endotoxic**, se poate instala si in cursul antibioterapiei unei infectii cu bacterii Gram negative,

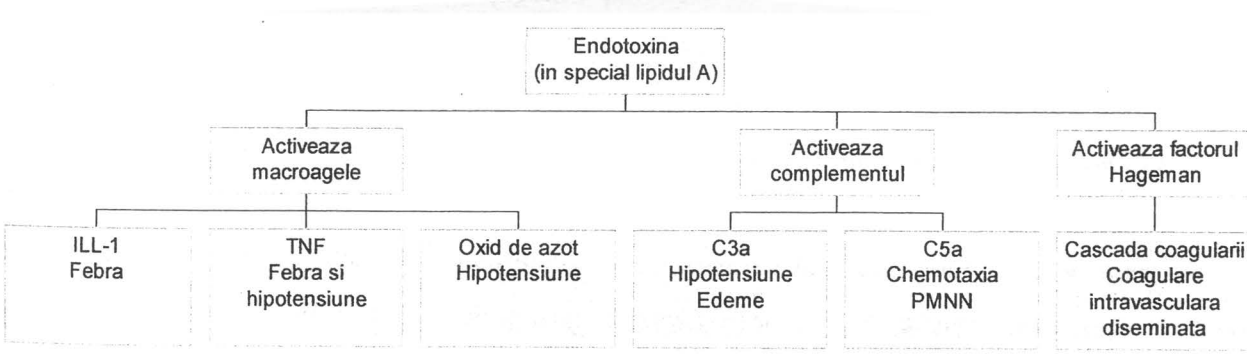
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

datorita eliberarii masive de endotoxine in cursul dezintegrarii celulelor moarte. Mortalitatea prin socul endotoxic, indus de prezenta endotoxinelor in circulatie este de ordinul 20 - 70%. Doua din sursele majore ale endotoxinei sunt infectia sângelui cu bacterii Gram negative (septicemia) si patrunderea bacteriilor din microbiota intestinala datorita unei leziuni a mucoasei respective. Toxicitatea este in mare masura determinata de interferenta cu sistemele de aparare nespecifice si specifice ale gazdei.

Termenii de endotoxina si LPS sunt frecvent utilizati ca sinonime; totusi **termenul de LPS** trebuie utilizat doar pentru moleculele de LPS purificate, iar **termenul de endotoxina** pentru LPS si eventualele proteine asociate, derivate din membrana externa, eliberate de pe suprafata celulara. Termenul de endotoxina, insemnând toxina bacteriana asociata, a fost initial utilizat pentru a distinge endotoxinele de toxinele proteice (exotoxine).

Socul endotoxic este o manifestare potential letala a infectiilor cu bacterii Gram negative, inclusiv cu enterobacterii. Endotoxina este un complex farmacologic activ, reprezentat de lipopolizaharidele (LPS) continute in peretele celular al bacteriilor Gram negative. LPS sunt tristratificate, stratul extern fiind constituit din hidrati de carbon variabili ca stuctura, care determina specificitatea antigenica (Ag O), extrema in cazul genului *Salmonella* (peste 2000 serotipuri). Stratul median este un miez polizaharidic asemanator la diferite specii, iar stratul intern are o structura inalt conservata, fiind reprezentat de lipidul A. Efectele biologice la LPS au fost demonstrate experimental injectant i.v. mici cantitati la animale , la care determina febra, leucopenie, hemoragii capilare, hipotensiune, colaps circulator, simptome care sunt in mare masura aceleasi cu cele observate la pacientii cu infectii septicemice cu bacterii Gram negative. Modul de actiune al endotoxinei este schematizat in fig. 10.

Fig. 10. Modul de actiune al endotoxinei produsa de bacteriile Gram negative, cea mai importanta cauza a socului septic, caracterizat in special prin febra, hipotensiune si coagulare intravasculara diseminata.



https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Testul cu lizat de limulus (care utilizeaza un reactiv preparat din amibocite ale crabului in forma de potcoava – *Limulus poliphemus*), a fost folosit cu rezultate variabile in diagnosticul socului endotoxic. Lizatul sufera un proces de gelificare cand vine in contact cu cantitati foarte mici, chiar urme de endotoxina.

Mai promitatoare in diagnosticul socului septic cu Gram – negativi este utilizarea anticorpilor monoclonali, in tehnica ELISA sau alte tehnici, prin care se poate detecta lipidul A, pentru ca efectele farmacologice ale endotoxinei sunt atribuite in primul rând lipidului A, care este puternic antigenic si are determinanti comuni tuturor tulpinilor de bacili Gram negativi. Astfel detectarea lipidului A circulant la pacientii cu septicemie cu Gram negativi poate stabili diagnosticul si o terapie presumtiva poate fi inceputa inainte ca agentul determinant al infectiei sa fie izolat si identificat.

*

Numeroase gene pentru produsi bacterieni responsabili de virulenta sunt localizate frecvent pe plasmide, desi plasmidele insesi nu sunt factori de virulenta. De asemenea, plasmidele R, care contin gene care confera rezistenta la antibiotice, pot fi considerate gene de virulenta, deoarece dobândirea rezistentei la agenti antibacterieni determina cresterea incidentei si raspândirea continua a infectiilor bacteriene.

Se considera in trecut, in mod gresit, ca pentru a controla bolile infectioase este necesara descoperirea de noi antibiotice si noi vaccinuri. Desi sunt importante si aceste mijloace de lupta impotriva infectiilor, ele nu au un rol decisiv. De exemplu, de aproximativ doua decenii nu s-a mai descoperit o clasa noua de antibiotice. Dar exista in prezent mijloacele necesare pentru a intelege factorii fundamentali utilizati de catre microorganisme pentru a determina infectia si boala. Stanley Falkow – specialist reputat in domeniul mecanismelor de patogenitate si virulenta, ca si al variatiei antigenice a facut recent urmatoarea afirmatie (1999): "Desi bolile infectioase fusesera declarate invinse la sfarsitul anilor'60 datorita producerii si utilizarii pe scara larga a antibioticelor, Louis Pasteur a avut dreptate : "bacteriile vor avea intotdeauna ultimul cuvânt" , in sensul ca evolutia gazda-parazit este un proces continuu si la orice mecanism de aparare al gazdei, bacteriile vor gasi mijloace de a le contracara sau evita.

Cum viata noastra se deruleaza intr-o lume de micoorganisme, iar o viata aseptica sau gnotobiotica este putin probabila, intelegerea mecanismelor de patogenitate si virulenta poate constitui premisa imaginarii unor noi strategii pentru controlul infectiilor microbiene si al bolilor consecutive.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Conditiile de aparitie ale procesului infectios si clasificarea infectiilor

Procesul infectios sau infectia (lat. *inficere* = a otavi, a deteriora) este determinata de capacitatea agentului patogen de a se localiza si multiplica in organism, asigurând stabilirea in gazda prin colonizarea tranzitorie sau de durata, ca si transmiterea la o noua gazda sensibila. Infectia poate fi inaparenta sau manifesta, in acest caz având o evolutie asociata cu perturbarea starii normale de sanatate a organismului-gazda si cu fenomene de disconfort, boala infectioasa având de multe ori un tablou clinic caracteristic.

Pentru aparitia unui proces infectios sunt necesare anumite conditii:

1. Izvorul de infectie generator de agenti infectiosi
2. Calea de eliminare a agentului infectios
3. Calea de transmitere de la izvor la un organism sensibil
4. Poarta de intrare a agentului infectios in organismul sensibil

1. Izvorul de infectie generator de agenti infectiosi

Mediul extern este nefavorabil dezvoltarii majoritatii microorganismelor patogene si mentinerii infectiozitatii virusurilor. Agentii infectiosi se pot raspândi pe diferite cai (aer, apa, alimente, om bolnav), infectând diferite gazde si generând:

- Zoonoze (infectii ale animalelor);
- Antropozoonoze (infectii ale animalelor, transmise accidental omului);
- Antroponoze (infectii prezente numai la om; ex: boli virale ca variola, varicela, oreion, poliomielita, guturai, hepatite; boli cu etiologie bacteriana ca dizenteria, febra tifoida, febra paratifoida, tusea convulsiva, sifilisul, gonoreea, lepra);

Agentii infectiosi sunt raspânditi si de purtatori, ca si de catre animale salbatice si domestice, cum ar fi de exemplu: câinele transmite virusul rabic, bovinele pot transmite salmonele, ca si bacilul Koch, ovinele pot transmite rickettsii, soarecii transmit leptospire, pasarile pot transmite chlamidii (agentii patogeni ai ornitozelor si psittacozelor), ca si virusuri encefalitice. Desi sunt dificil de controlat, aceste schimburi intre rezervoarele de infectie salbatice si cele domestice si om sunt dovedite si se insotesc de cresterea virulentei agentilor patogeni.

2. **Calea de eliminare** depinde de localizarea agentului infectios in organismul gazda; de exemplu:

- *Calea intestinala* este specifica pentru agentii patogeni enterotropi, acestia eliminându-se in materiile fecale, continuu sau intermitent; pe aceasta cale se elimina agentii patogeni ai febrei

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

tifoide si paratifoide, ai dizenteriei, ai holerei, ai toxiinfectiilor alimentare, virusul hepatitei A si al poliomielitei;

- *Calea respiratorie* (prin intermediul picaturilor Pflugge, formate in cursul actelor fiziologice de vorbit, stranut, tuse si in care agentii infectiosi sunt protejati de glicoproteinele salivare) este specifica unor agenti patogeni, cum ar fi: bacilul difteric, agentul patogen al tusei convulsive, agentii patogeni ai rujeolei, varicelei, oreionului, gripei, guturaiului;
- *Solutiile de continuitate* (rani deschise, care creeaza continuitate intre mediul extern si cel intern al organismului gazda) – pe aceasta cale se pot transmite agentii patogeni ai stafilocociilor cutanate, ai gangrenei gazoase;
- *Calea urinara* – pe aceasta cale se pot transmite agentii patogeni ai febrei tifoide, ai leptospirozei, ai febrei Q, ai tuberculozei renale;
- *Secretia lactata* poate transmite agentii patogeni ai febrei Q, ai tuberculozei, ai brucelozei;
- In infectiile generalizate, care nu au poarta de eliminare, agentii patogeni pot parasi organismul gazdei prin intermediul unui *vector hematofag.* Infectii transmise pe aceasta cale: tifosul exantematic (*Rickettsia prowazecki*), ciuma (*Yersinia pestis*), paludismul (*Plasmodium malariae*), encefalitele virale;
- *Instrumentele medicale* (mai ales cele cele chirurgicale incorect sterilizate) pot transmite agentii patogeni ai unor infectii, cum ar fi: hepatita B, sifilis (*Treponema pallidum*), SIDA (HIV).

3. **Calea de transmitere.**

Agentii patogeni se transmit de la izvorul de infectie, la o gazda receptiva, prin:

- contact direct – intre organismul infectant si receptor exista o legatura directa: prin contact sexual (hepatita B, sifilis, gonoree, SIDA), prin muscatura (rabie), prin supt (febra Q, tuberculoza – la om si animale), prin sarut (TBC pulmonar, sifilis), prin contact cutanat (dermatomicoze, furunculoza).

4. **Poarta de intrare.** Pentru a putea intra in organism, agentii infectiosi trebuie sa invinga barierele naturale. Poarta de intrare trebuie sa corespunda caii prin care s-a facut eliminarea agentului patogen:

- calea digestiva: hepatita A (digestiva), febra tifoida, dizenteria, holera, febra Q;
- calea respiratorie: oreion, guturai, gripa, rujeola, variola, varicela;
- calea cutanata (prin leziuni, mai dificil prin tegumentul intact) : antrax, febra Q, turbare;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Exista microorganisme care pot patrunde pe mai multe cai (principale + secundare) si determina aceste manifestari, indiferent de calea de intrare. Pot produce manifestari clinice diferite, conditionate de poarta de intrare:

Bacillus anthracis: patruns pe cale cutanata determina carbune cutanat;
,, ,, digestiva ,, ,, digestiv;
,, ,, respiratorie ,, ,, infectii respiratorii.

In tabelul nr. 6 sunt prezentate principalele tipuri de infectii in functie de poarta de intrare, mecanismele locale de aparare ale gazdei, ca si mecanismele de evitare a acestora de catre agentii patogeni virulenti.

INFECTIA – definitie

Prin infectie se intelege totalitatea proceselor biologice care se desfasoara in organismul uman sau animal, ca urmare a patrunderii si multiplicarii agentului patogen. Acesta trebuie sa patrunda int-o doza suficienta, care sa permita multiplicarea agentului infectios.

Relatia agent patogen – gazda este o relatie ecologica, in care agentul patogen este forta motrice a procesului infectios, iar reactivitatea organismului moduleaza evolutia procesului infectios.

a)Clasificarea infectiilor dupa specificitatea relatiei agent patogen – proces infectios; in functie de acest criteriu, exista mai multe tipuri de infectii:

1) Infectii determinate de un anumit agent patogen; ex.: *Clostridium tetani* – tetanos; *Treponema pallidum* – sifilis;
2) Infectii lipsite de specificitate: nefrite – produse de diferiti agenti patogeni, cum ar fi: *E. coli. Enterococcus faecalis, Pseudomonas aeruginosa*; meningite, peritonite determinate de diferiti agenti patogeni;
3) Infectii cu specificitate medie: de ex. *Mycobacterium tuberculosis* este agentul etiologic al tuberculozei pulmonare, renale, osoase, cutanate.

b) Clasificarea infectiilor in functie de perioada de viata in care se pot instala:

1) infectii germinale – celulele sexuale sunt invadate de agenti infectiosi, ajungând apoi in zigot; nu exista astfel de cazuri la om si organismele superioare in general, ci doar la artropode ;
2) infectii transplacentare – in cursul vietii intrauterine, in conditiile existentei unor infectii prealabile (cu *Treponema pallidum, Brucella sp., Coxiella burneti*) sau produse in aceasta perioada (cu virusurile rubeolic, rujeolic – care pot determina malformatii congenitale);
3) infectii *intrapartum* – initiate in timpul nasterii, cu bacterii potential patogene din tractul genital feminin (ex.: oftalmia gonococica – *Neisseria gonorrhoeae*);

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabel nr. 6. Principalele tipuri de infectii dupa localizare care corespunde portii de intrare in organism a agentului patogen si mijloacele de aparare ale gazdei, carora le corespund anumite mecanisme de evitare a acestor reactii de catre agentii infectiosi (mecanisme de virulenta).

Tipuri de infectii dupa localizare	**Mijloace de aparare ale gazdei**	**Mecanisme de virulenta ale agentilor infectiosi, de evitare a reactiilor de aparare ale gazdei**	**Exemple**
Infectii ale tractului respirator	*Clearance*-ul mucociliar, Macrofage alveolare	Aderenta la celulele epiteliale Interferenta cu actiunea cililor celulelor epiteliale Replicarea in macrofagele alveolare	Virusul gripal *Bordetella pertussis* *Legionella pneumophila* *Mycobacterium tuberculosis*
Infectii ale tractului intestinal	Mucus, peristaltism acid, bila	Aderenta la celulele epiteliale Rezistenta la acid, bila	Rotavirus *Salmonella sp.* Virusul poliomielitic
Infectii ale ficatului	Celulele Kupffer si celulele endoteliale	Localizarea in capilarele sinusoide si in celulele Kupffer si endoteliale	Virusuri hepatitice
Infectii ale aparatului genital	Actiunea de spalare a fluxului urinii si a secretiilor sexuale, mecanisme de aparare ale mucoaselor	Aderenta la celulele epiteliale uretrale si vaginale	*Neisseria gonorrhoeae,* *Chlamydia trachomatis*
Infectii ale tractului urinar	Actiunea de spalare a fluxului urinii	Aderenta la uretra/celulele epiteliale	*Escherichia coli* Virusul poliomielitic
Infectii ale sistemului nervos central		Patrunderea in sistemul nervos central pe calea nervilor sau vaselor de sânge	Meningita bacteriana Encefalita virala
Infectii ale pielii si mucoaselor	Straturi de celule constant umede (mucoase) Straturi de celule keratinizate moarte (piele)	Invazia pielii si mucoaselor din interior Infectia stratului epidermic bazal Infectii prin leziuni mici Penetrarea pielii intacte	Virusul varicelei, pojarului Virusuri *Papiloma* *Staphylococcus sp.* *Streptococcus sp.* ***Bacillus anthracis*** *Schistosoma sp.*
Infectii ale sistemului vascular	Integritatea tegumentului	Injectarea agentului patogen de catre un vector Replicarea in celule ale sângelui sau in celulele endoteliale	*Plasmodium malariae* Virusul febrei galbene

4) infectii *postpartum*, care se produc dupa nastere, categorie in care intra majoritatea infectiilor umane care se produc dupa vârsta de 5 – 6 luni, perioada dupa care dispare protectia

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

exercitata de anticorpii materni transmisi transplacentar sau prin secretia lactata, care confera imunitate pasiva.

Starea caracteristica a organismului infectat, inainte de declansarea simptomelor, este cea de *contaminare*. La poarta de intrare in organism agentul patogen trebuie sa se multiplice, crescând sansa colonizarii organismului odata cu realizarea conditiei cantitative (doza infectanta) pentru aparitia unui proces infectios, deoarece la contaminare numarul de germeni este mic. Cu cât tulpina este mai virulenta, cu atât numarul de celule necesare declansarii procesului infectios este mai mic. Consecinta colonizarii este aparitia unui focar de inflamatie (reactie de aparare locala insotita de un aflux de fagocite si de aparitia unei supuratii).

Tipuri de infectii in functie de gradul de extindere:

1) infectii localizate – reactiile de aparare ale gazdei sunt inca eficiente;
2) infectii generalizate- reactiile de aparare nu se pot opune germenului infectios (care in mod normal ar putea fi localizat).

Infectia locala sau de focar este produsa de agenti patogeni care ramân la poarta de intrare in organism, difuzând pe cale sanguina sau nervoasa doar produsii toxici secretati de catre acestia. Infectia de focar este insotita de o reactie inflamatorie locala minima si de manifestari la distanta, determinate de produsi toxici, enzimatici eliberati la nivelul focarului. Ex.: reumatism - streptococii ramâne la poarta de intrare (amigdale), dar elibereaza toxine si enzime difuzibile.

In *infectiile generalizate* sau invazive, dupa o perioada de multiplicare la poarta de intrare, agentii patogeni disemineaza in organism, prin:

- **contiguitate :** cei cu multiplicare intracelulara (virusuri, rickettsii, chlamidii) si care infecteaza celulele vecine;
- **continuitate :** infectii cavitare: infectii respiratorii, care avanseaza spre trasee inguste si dau bronsite, spre tesutul pulmonar- pneumonii, spre pleure- pleurite; infectii genitale ;
- **cale limfatica**- agentii patogeni sunt preluati de la suprafata tegumentului si mucoaselor; de ganglionii limfatici care nu pot retine toti germenii daca sunt numerosi, astfel ca acestia ajung in sânge, determinând *bacteriemie* (bacteriile sunt totusi in numar mic), consecutiva infectiilor usoare, extractiilor dentare, interventiilor chirurgicale sau postprandial (mai ales la rumegatoare); in sânge bacteriile nu se multiplica (cu exceptia *Yersinia sp., B. anthracis*), dar pot determina infectii regionale, mai mult sau mai putin extinse sau infectii generalizate, pe cale circulatorie. Dintr-o infectie regionala, pe cale circulatorie, pot aparea localizari secundare unice sau multiple (miliare), evoluând spre o infectie generalizata sau *septicemie*. Infectiile septicemice se caracterizeaza printr-un numar mare de germeni in sângele circulant,

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

datorita descarcarii masive dintr-o infectie regionala sau focar si poate avea loc chiar si multiplicarea lor in sânge; uneori septicemia este insotita de toxemie; se datoreaza scaderii eficientei reactiilor de aparare ale gazdei.

Alte manifestari clinice ale patologiei infectioase

1) **Intoxicatia** – botulism (incidenta mica)- agentul patogen (*Clostridium botulinum*) se multiplica in alimente, produce toxina botulinica, care patrunde in organism odata cu alimentele contaminate;
2) **Toxiinfectia** – bacteriile se multiplica la poarta de intrare in organism si produc toxine care difuzeaza in organism;

   Ex.: *Clostridium tetani* – toxina difuzeaza spre neuronii motori si determina leziuni caracteristice; *Corynebacterium diphteriae* – se localizeaza in gât, iar toxina difuzeaza spre celulele musculare cardiace, celulele renale;

   -toxiinfectii alimentare - alimente contaminate sau provenite de la animale bolnave; ex. *Salmonella sp.*- bacteriile produc endotoxine (componente structurale ale peretelui celular) si enterotoxine.

Evolutia procesului infectios

Infectie inaparenta - procesul infectios nu se exteriorizeaza prin simptome clinice de boala, dar se pozitiveaza reactiile imunologice:

Ex. : TBC inaparenta – reactie de hipersensibilitate intârziata cutanata - I.D.R. la tuberculina; reactia trebuie sa fie slab pozitiva la toti indivizii vaccinati, dar intens pozitiva doar la cei bolnavi (reactia se exprima in 48 ore, printr-o papula rosie, indurata).

Infectie aparenta – se exteriorizeaza prin simptome clinice, produse de germenul infectios si metabolitii sai.

Etapele procesului infectios

1) **Incubatia** – perioada initiala, asimptomatica = intervalul de timp de la patrunderea agentului patogen in organism si pâna la debutul bolii; durata este variabila in functie de doza infectanta, virulenta tulpinii, reactivitatea organismului. Agentii infectiosi se multiplica si sintetizeaza substante toxice; uneori manifesta un tropism, multiplicându-se preferential in anumite tesuturi si organe: ex. *Vibrio cholerae* - in epiteliul intestinal, *Brucella sp.* -in placenta ovinelor (eritrol), *Rickettsia prowazecki* - in endoteliul capilarelor, *Bordetella pertussis* – in mucoasa bronsica, *B. anthracis* – in tot organismul, fara tropism.
2) **Debutul bolii** – momentul in care apar primele simptome de boala care pot fi specifice sau nespecifice (febra, cefalee, frisoane, diaree); marcheaza inceputul perioadei de invazie.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

3) **Perioada de stare** - bolile infectioase prezinta un tablou clinic cu simptome caracteristice, de amplitudine maxima in aceasta etapa. Perioada este decisiva pentru procesul infectios; la sfarsitul acesteia simptomele dispar brusc (*in crysis*) sau lent (*in lysis*) si organismul poate ramâne vindecat bacteriologic sau infectat.

4) **Perioada de convalescenta** – incepe odata cu disparitia simtomelor; titrul anticorpilor este maxim; acesti efectori imunitari umorali specifici, alaturi de alti efectori specifici si nespecifici pot conduce la sterilizarea focarului de infectie sau pot ajunge in starea de purtator. Ex. *Salmonella typhimurium* – ramâne cantonata in vezica biliara, fiind eliminata prin materiile fecale; *Streptococcus pyogenes* (tulpini lizogene - agenti patogeni ai scarlatinei) este eliminat timp de câteva saptamâni dupa perioada de stare.

5) **Infectie cronica** - organismul ramâne infectat si elimina germeni multi ani, acestia fiind intr-o stare de echilibru cu gazda. Germenii ramân cantonati in viscere parenchimatoase, sinusuri, glande incapsulate (prostata), peretii arterelor mari, unde anticorpii nu au acces. Bolile cronice se pot reacutiza (recadere): bruceloza, tuberculoza, tifosul exantematic.

6) **Starea de purtator.** Un organism este purtator al unor bacterii patogene, aceasta stare putând fi precedata sau nu de o boala. Daca numarul infectiilor simptomatice (manifeste) ar constitui vârful *iceberg* -ului, partea submersa, nevazuta a acestuia ar fi reprezentata de infectiile asimptomatice prezente la indivizi care sunt purtatori de agenti patogeni, care îi infecteaza pe altii si realizeaza seroconversia acestora. In cazul multor agenti infectiosi agresivi, este importanta depistarea purtatorilor si sterilizarea lor din punct de vedere microbiologic, aceasta fiind una din masurile de prevenire a bolilor infectioase

Tipuri de evolutie epidemiologica a infectiei

Epidemiologia este stiinta care studiaza caile de eliminare, transmitere si patrundere ale agentilor infectiosi in organismul gazda. Din punct de vedere epidemiologic procesul infectios are manifestari spatio-temporale :

- **evolutie sporadica**- se caracterizeaza printr-un numar limitat de cazuri de imbolnaviri in unitatea de timp;
- **evolutie endemica** – se caracterizeaza printr- un numar de cazuri relativ mic, dar care este constant intr-o colectivitate si au o regularitate in timp; variatiile sezoniere au un rol in aparitia infectiilor, fata de care majoritatea indivizilor sunt imunizati ;
- **evolutie epidemica** – se caracterizeaza printr-un numar mare de cazuri de imbolnaviri intr-un interval scurt de timp; gradul de extindere poate fi diferit, la nivel de camin, cazarma, sat, oras, tara ; ex. scarlatina, gripa, rujeola ;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- **evolutie pandemica** – se caracterizeaza printr-o extindere rapida (favorizata de mijloacele de transport pentru calatori si marfuri) pe un areal larg, la nivel de tari, continente ; ex.- gripa. Populatia unei zone poate fi susceptibila la agentul patogen din alta zona, acesta putând sa determine o epidemie exploziva; dupa instalarea starii de imunitate in populatie, incidenta cazurilor scade. La aparitia de noi variante antigenice ale agentului infectios, epidemia se poate repeta.

Aparitia epidemiilor este influentata de standardul economic (de ex. in cazul tuberculozei) si social (de ex. in cazul bolilor cu transmitere sexuala) al populatiei.

*

In continuare, sunt clasificate si caracterizate grupele mari de bacterii si de microfungi semnificative pentru patologia umana, mai detaliat sau mai succint, dupa cum sunt mai frecvent (ex. enterobacterii, stafilococi, streptococi, bacterii anaerobe) sau mai putin frecvent izolate in laboratorul clinic.

Criteriile de clasificare sunt cele clasice, utilizate in bacteriologie : prezenta sau absenta peretelui celular, rigiditatea sau flexibilitatea acestuia, structura peretelui celular care determina comportamentul bacteriilor fata de coloratia Gram si le diferentiaza in Gram pozitive si Gram negative, morfologia bacteriilor : coci, bacili – filamentosi, nefilamentosi sau incurbati, criterii fiziologice : capacitatea de sporogeneza, tipul respirator (bacterii aerobe, anaerobe, aerobe facultativ anaerobe), tipul de parazitism (extracelular sau intracelular – facultativ sau obligat) (tabel nr. 7). Sunt semnalate si cazuri in care anumite specii au fost reincadrate taxonomic, datorita unor argumente furnizare de rezultatele tehnicilor genetice la nivel molecular. Prezentarea fiecarui grup de microorganisme patogene, a biologiei, a mecanismelor de patogenitate si virulenta la nivel molecular, a structurii lor antigenice, este insotita si de principiile pe care se bazeaza diagnosticul de laborator al infectiilor determinate de acestea (prin metode clasice si moderne), detaliate in ultimul capitol, deoarece o preocupare importanta a microbiologilor este stabilirea unui diagnostic microbiologic corect, monitorizarea incidentei bolilor infectioase, ca si stabilirea unor strategii de prevenire a acestor boli. Dupa prezentarea grupelor de bacterii semnificative pentru patologia umana, este inclus si un capitol referitor la substantele antibiotice, la modul lor de actiune pe care se bazeaza utilizarea acestor substante in terapia antiinfectioasa, ca si la fenomenul de rezistenta si multirezistenta la antibiotice, aparut ca efect al impactului ecologic exercitat de presiunea selectiva a antibioticelor asupra populatiilor bacteriene, fenomen tot mai amplu si cu o semnificatie deosebita.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Principalele grupe de microorganisme patogene

– caractere generale si diagnosticul de laborator al infectiilor determinate

Tabel nr. 7. Clasificarea bacteriilor importante din punct de vedere medical.

Caracteristici	Genul	Boli reprezentative
I. Bacterii cu perete celular gros, rigid		
Bacterii parazite extracelular		
1. Gram-pozitive		
a. Coci	*Staphylococcus sp.*	Abcese ale pielii sau altor organe
	Streptococcus sp.	Pneumonie, faringita, amigdalita
b. Bacili sporogeni		
1) Aerobi	*Bacillus anthracis*	Antrax
2) Anaerobi	*Clostridium sp.*	Tetanos, gangrena gazoasa, botulism
c. Bacili nesporogeni		
1) Nefilamentosi	*Corynebacterium sp.*	Difterie
	Listeria	Meningita
2) Filamentosi	*Actinomyces sp.*	Actinomicoza
	Nocardia sp.	Nocardioza
2. Gram-negative		
a. Coci	*Neisseria sp.*	Gonoree, meningita
b. Bacili		
1) Facultativ anaerobi		
i) Drepti		
- Respiratori	*Haemophilus sp.*	Meningita
	Bordetella sp.	Tuse convulsiva
	Legionella sp.	Pneumonie
- Enterici	*Escherichia coli*	Infectii urinare, diaree
	Enterobacter sp.	Infectii urinare
	Serratia sp.	Pneumonie
	Klebsiella sp.	Pneumonie, infectii urinare
	Salmonella sp.	Febra tifoida, enterocolite
	Shigella sp.	Enterocolite
	Proteus sp.	Infectie urinara
- Zoonotici	*Yersinia sp.*	Ciuma
	Brucella sp.	Bruceloza
ii) Incurbati	*Campylobacter sp.*	Enterocolite
	Helicobacter sp.	Gastrite, ulcer peptic
	Vibrio sp.	Holera
2) Aerobi	*Pseudomonas sp.*	Pneumonie, infectii urinare
3) Anaerobi	*Bacteroides sp.*	Peritonita
3. Acidoalcoolorezistente	*Mycobacterium sp*	Tuberculoza, lepra
Bacterii parazite obligat intracelular	*Rickettsia sp.*	Tifos exantematic si pulmonar, febra butonoasa
	Bartonella sp.	Fb. de transee,boala ghearelor de pisica
	Chlamydia sp.	Uretrita, trahom, psitacoza
II. Bacterii cu perete celular subtire, flexibil (spirochete)	*Treponema sp.*	Sifilis
	Borrelia sp.	Boala Lyme
	Leptospira sp.	Leptospiroza
III. Bacterii fara perete celular	*Mycoplasma sp.*	Pneumonie, infectii genitale

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

COCI GRAM POZITIVI

Staphylococcus sp.

In manualul Bergey , editia din 1986, stafilococii au urmatoarea incadrare taxonomica :

Fam. ***MICROCOCCACEAE***

Micrococcus sp.
Planococcus sp.
Stomatococcus sp.
Staphylococcus sp

Studiile la nivel molecular, bazate pe experimente de hibridizare si stabilirea gradului de omologie a acizilor nucleici, la care s-a adaugat si analiza altor proprietati (compozitia chimica a peretelui celular, determinarea continutului in acizi grasi celulari) au demonstrat ca aceste genuri nu sunt foarte inrudite, asa cum se credea; astfel genul *Micrococcus* este mai inrudit cu actinomicetele, iar speciile apartinând genului *Staphylococcus* sunt genetic mai asemanatoare cu streptococii, enterococii, lactobacilii, ca si cu speciile genului *Bacillus.*

Aceste bacterii sunt larg raspândite in natura, fiind prezente in mediul acvatic, in sol si aer, dar si in calitate de comensali pe piele si mucoase, la om si animale.

Multe specii sunt patogene, fiind microorganismele cel mai frecvent izolate din probele biologice in laboratoarele de microbiologie medicala, dupa enterobacterii. Distributia ubicvitara a unor bacterii Gram pozitive in natura face dificila interpretarea rezultatelor analizelor, cu exceptia cazurilor in care boala infectioasa respectiva are manifestari clinice clasice. Desi bacteriile Gram pozitive pot cauza infectii prin multiplicare atât locala, cât si sistemica, majoritatea se multiplica local si exercita efecte patogene prin produsii metabolici eliminati in mediu (exotoxine si exoenzime), care actioneaza la distanta. Toxinele stafilococice sunt responsabile pentru toxiinfectiile alimentare, sindromul de descuamare a pielii si pentru TSS (*toxic shock syndrome*).

Micrococcus sp. (9 specii): speciile incadrate in acest gen sunt prezente in mediul extern, dar sunt si componente posibile ale microbiotei de tranzitie (alohtone) a tegumentelor la om si alte mamifere. Anumite specii sunt cromopare, producând pigmenti carotenoizi care coloreaza coloniile in galben sau roz, ceea ce explica utilizarea ca lor microorganisme indicatoare, pentru detectarea agentilor antimicrobieni in hrana animalelor, cosmetice si in lichide biologice. Se pot manifesta ca oportunisti la gazde imunocompromise. Astfel, recent au fost raportate cazuri de infectii asociate cateterelor, peritonite, corelate cu procedura de dializa peritoneala.

Planococcus sp.: acest gen include specii prezente in apa, aer, sol, care nu sunt implicate in patologia umana. Sunt frecvente in mediul marin, comensale ale florei si faunei oceanice, ca si

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

in hrana de origine marina inghetata. Celulele sferice, flagelate, sunt grupate in gramezi sau in tetrade. Nu fermenteaza zaharurile, sunt halotolerante (1 - 15 %). Sintetizeaza un pigment galben-portocaliu pe geloza nutritiva (*P. citreus* si *P. kocuri).*

Stomatococcus mucilaginosus este o specie (numita anterior *Micrococcus mucilaginosus*) de coci capsulati care sunt membri ai microbiotei normale a tractului respirator la om. Bacteria este imobila, slab catalazo-pozitiva sau chiar negativa; nu creste pe geloza cu 5% NaCl, ceea ce permite diferentierea de *Micrococcus* si *Staphylococcus*. Culturile sunt mucilaginoase.

Prima infectie a fost raportata in 1978, la un pacient cu endocardita, postcateterizare cardiaca. Apoi, au fost semnalate si alte cazuri de endocardita la pacienti cu valve protetice. In general, infectiile au fost asociate cu traumatisme la cap si la gât, cu utilizarea de catetere centrale si periferice, cu procedura de cateterizare cardiaca postinfarct miocardic, cu dializa peritoneala continua in ambulator, cu chemoterapia anticanceroasa. Au fost raportate ca infectii secundare care insotesc diferite tipuri de cancer, la pacientii cu transplant de maduva. La acesti pacienti este prezenta bacteriemia tranzitorie sau persistenta, infectii asociate dispozitivelor protetice (pe care se pot dezvolta biofilme bacteriene) si meningite. Pacientii prezinta neutropenie consecutiva bolii primare, imunosupresiei sau chemoterapiei. Aceasta specie poate fi si agentul cauzal al endoftalmitei, consecutiva implantarii lentilelor de contact; a fost izolata si din bila, de la pacienti cu colangita.

Dintre bacteriile incadrate intre micrococacee, cele mai implicate insa in patologia umana sunt stafilococii, care determina un mare numar de boli: foliculite, furuncule, abcese, endocardite si infectii asociate dispozitivelor protetice confectionate din biopolimeri etc. Alte afectiuni sunt determinate de toxinele stafilococice, cum sunt: toxiinfectiile alimentare, sindromul de descuamare a pielii, TSS (*toxic shock syndrome*).

Caractere: coci Gram pozitivi, grupati in gramezi neregulate (fig. 11), nesporogeni, aerobi, facultativ anaerobi (exista si coci Gram pozitivi strict anaerobi, membri ai microbiotei intestinale normale: *Peptococcus, Peptostreptococcus*), catalazo-pozitivi, care fermenteaza glucoza si determina acidifierea mediului), fara producere de gaz.

Speciile de stafilococi cel mai frecvent izolate in clinica sunt: *S. aureus, S. epidermidis, S. saprophiticus.*

S aureus subsp. aureus este specia patogena cea mai importanta pentru om dintre stafilococi, fiind prezenta in mediul extern, dar si in narile a 20 – 40 % dintre indivizi. Alte situsuri de colonizare: pliuri ale pielii, perineu, axile, vagin. Desi este un frecvent membru al microbiotei normale, poate determina infectii oportuniste. Factorii predispozanti sunt:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

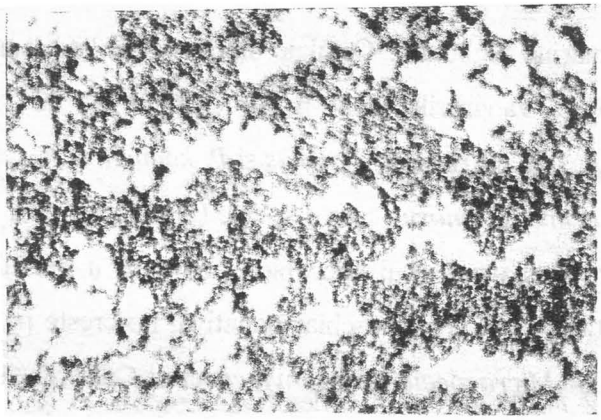


Fig. 11. Imagine la microscopul optic a unui preparat colorat Gram efectuat dintr-o cultura de *Staphylococcus aureus* in care se observa coci dispusi in gramezi neregulate (marire : x 2500).

deficiente de opsonizare (hipogamaglobulinemie), deficiente ale activitatii microbicide consecutive fagocitarii germenilor (granulomatoza cronica), leziuni ale pielii (arsuri, incizii chirurgicale, eczeme), prezenta de corpi straini : suturi, catetere intravenoase, dispozitive protetice, infectii virale (gripa), boli cronice (boli maligne, alcoolism, boli cardiace).

S aureus este o specie coagulazo - pozitiva, cu proprietati hemolitice, patogena la om si animale. Denumirea speciei se datoreaza producerii unui pigment auriu in conditii favorabile de crestere. In conditii de mediu nefavorabil se pierde capacitatea de pigmentogeneza, ca si cea a producerii de coagulaza. Bacteriile au forma sferica, cu un diametru ce variaza intre 0,8 – 1 μm; cocii sunt izolati in mediu lichid si grupati in gramezi când provin de pe medii solide. Celulele prezinta fimbrii si o microcapsula, ce poate fi evidentiata la celule din culturi de patru ore in bulion nutritiv, prin tehnica coloratiei negative cu tus de China. Aceste structuri extraparietale mediaza aderenta la substraturi sensibile si au rol antifagocitar direct si indirect, având efect chimiotactic negativ. Stafilococii, bacterii Gram pozitive, prezinta un perete celular tipic structurat acestui grup, componentele majore fiind mureina, acizii teichoici si stratul proteic paracristalin, proteina A fiind predominananta si specifica speciei *S. aureus* (cu exceptia speciei *S. epidermidis hyicus*).

Particularitati fiziologice. Dezvoltarea culturilor are loc in aerobioza, stafilococii fiind facultativ anaerobi. Sinteza toxinelor este favorizata de cresterea in atmosfera de CO_2 5-10%. Temperatura optima de dezvoltare variaza intre 30 – 37°C, pH-ul optim variaza intre 7 – 7,5.

Exigentele nutritive sunt minime, totusi speciile patogene necesita prezenta in mediu a aminoacizilor si a factorilor de crestere (tiamina, acid nicotinic). Dupa 16 – 18 ore de incubare, culturile in mediu lichid sunt tulburi uniform, iar culturile pe mediu solid permit observarea

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

coloniilor circulare (Φ =1mm), bombate, opace, cu o consistenta cremoasa, cu margini regulate, suprafata neteda, lucioasa, pigmentate in galben citrin. Cercetarea pigmentogenezei se face prin cultivare in prezenta serului bovin coagulat, cu incubare timp de 27h la 37°C si apoi 24h la 25°C, la lumina zilei. Exista si tulpini de *S. aureus* care nu produc pigment. Importanta pentru identificare este producerea de *coagulaza*. Producerea de catalaza permite diferentierea de *Streptococcus sp.* Fermenteaza manitolul si cresc in prezenta unei concentratii mari de Na Cl – 7,5 - 10%. Halotoleranta si fermentarea manitolului permit diferentierea speciei *S. aureus* de *S. epidermidis*, pe mediul Chapman (mediu hipersalin si cu adaus de manitol).

Rezistenta la factori fizico-chimici. Stafilococii au o rezistenta mare la uscaciune, rezistând timp de saptamâni si luni in produse biologice uscate (puroi, sputa), dar si in praful de camera si chiar in nisipul plajelor. Sunt distrusi prin expunere la 60°C, timp de 30 min., in prezenta fenolului 5%, timp de 10 min si a alcoolului etilic de 70°, timp de o ora. Fenomenul rezistenta la antibiotice rezistente la penicilinaza (ex. meticilina) este foarte frecvent printre tulpinile de *S. aureus*, care pot fi cauza unor infectii nosocomiale dificil de tratat, tratamentul de electie al acestora facându-se cu vancomicina.

Structura antigenica.

1) Ag polizaharidice – A – componentul major, derivat al acidului teichoic (acid ribitolteichoic) care confera specificitate de specie pentru *S. aureus.*
   - B – acid glicerolteichoic, caracteristic speciei *S. epidermidis.*
2) Ag proteice- **proteina A** – bazica, situata superficial; este precipitata si de serurile neimune, deoarece se leaga de regiunea Fc a imunoglobulinelor (nespecific ; proteina A izolata de la tulpina Cowan este utilizata pentru purificarea Ig). Este caracteristica speciei *S. aureus* , fiind un factor de agresivitate, prin efectul antifagocitar. Este imunogena, Ac anti proteina A fiind prezenti la indivizii cu infectii grave.

Diferentierea serologica a stafilococilor nu este necesara, identificarea tulpinilor de *S. aureus* facându-se prin **tipizare fagica**.

Factori de virulenta.

- microcapsula – factor de agresivitate care mediaza aderenta la tesutul sensibil;
- exoenzime – *coagulaze*: 1) *libera* (determina coagularea plasmei, localizarea infectiei si blocarea accesului factorilor bactericizi) si *legata* (*clumping factor*);
- hialuronidaza – factor de invazie care actioneaza la inceputul infectiei, pentru ca procesul inflamator inhiba actiunea acestei enzime;
- stafilokinaza = fibrinolizina (factor de difuzie);

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- fosfataza acida (determina scaderea pH-ului mediului in focarul de infectie);
- lipazele (actioneaza asupra lipidelor plasmatice si tegumentare, ceea ce explica tropismul si colonizarea tegumentelor cu glande sebacee active);
- nucleazele = fosfodiesteraze, care desfac moleculele de ADN si ARN in nucleotide;
- toxine – hemolizine – actiune hemolitica si dermonecrotica;
  - α - toxina stafilococica $\Rightarrow$ hemoliza de tip β; actiune citotoxica selectiva asupra celulelor musculare netede din peretii vaselor sanguine $\Rightarrow$ vasoconstrictie $\Rightarrow$ ischemie si necroza tisulara;
  - β - toxina $\Rightarrow$ hemoliza cald-rece (zona de liza este neclara dupa incubare la 37°C, dar se clarifica la periferie, dupa mentinere 24 de ore la frigider);
- enterotoxine – difuzibile, manifesta tropism pentru mucoasa intestinala; 6 tipuri antigenice (A - F), codificate de determinanti genetici cromozomali sau plasmidiali; termorezistente (rezista 30 min la fierbere); pot fi evidentiate prin difuzie in gel; prezente la tulpinile producatoare de termonucleaze;
- leucocidina –fagocitele sunt lizate; acumularea resturilor celulare + bacterii $\Rightarrow$ puroi;
- toxina epidermolitica si exfolianta – codificata de plasmide, diferite de cele care determina rezistenta la peniciline.

Tulpinile izolate de la om apartin la 6 biotipuri, diferentiate dupa caracterele de cultura, biochimice, specificitatea de gazda, sensibilitatea la bacteriofagi (tulpinile din grupul fagic 2 au tropism pentru tesutul cutanat si determina infectii tegumentare).

S. epidermidis este o specie coagulazo-negativa, sensibila la novobiocina, comensal al tegumentelor, care determina frecvent infectii asociate cateterelor, la indivizii imunocompromisi.

S. aureus – localizare si patogenie

Bacteriile sunt prezente in vestibulul nazal, de unde colonizeaza tegumentele, intestinul subtire, colonul si alimentele. Sunt conditionat patogene, determinând infectii minore sau grave:

1. Foliculite superficiale, impetigo (infectie frecventa la copii) ;
2. Septicemii ;
3. Meningite ;
4. Endocardite.

Dupa localizare infectiile stafilococice pot fi:

- la poarta de intrare – la nivelul pielii si mucoaselor; grupul fagic 2 cuprinde stafilococi cu tropism pentru tesutul cutanat; elimina toxine codificate de plasmide care produc «sindromul pielii oparite » la copii, ca si leziuni la distanta, caracterizate prin distrugerea substantei-ciment si exfolierea epidermei ;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

ex.: foliculite ale genelor (*orgelet* = urcior), foliculite profunde (furuncul), in care infectia este prezenta la nivelul foliculului, dar si al glandei perifoliculare, acneea pustuloasa, hidrosadenita (infectii ale glandelor sudoripare), plagi sau arsuri contaminate, infectii ale tractului respirator superior sau inferior (pneumonii, care sunt frecvente la persoane in vârsta, dupa viroze, dar si ca infectii cu transmitere nosocomiala), otite, conjunctivite. Stafilococii pot fi prezenti in numar mare si postantibioterapie cu antibiotice de spectru larg, determinând enterocolita spitalizatilor (ulceratii si necroza) ;

- la nivelul aparatului urinar – staza urinara favorizeaza multiplicarea stafilococilor in vezica urinara si apoi infectiile pe cale ascendenta, ale ureterelor si rinichilor ;
- la nivelul tractului genital feminin pot determina infectii ale trompelor uterine (salpingite), ovarite si pelviperitonite ;
- la nivelul sistemului osos pot produce osteomielite ;

Desi bacteriile Gram pozitive pot cauza infectii prin multiplicare atât locala, cât si sistemica, majoritatea se multiplica local si exercita efecte patogene prin producerea de exotoxine si/sau exoenzime care actioneaza la distanta. Toxinele stafilococice sunt responsabile pentru toxiinfectiile alimentare (ocupând locul secund, dupa cele determinate de speciile enterotoxigene de *Salmonella),* sindromul de descuamare a pielii, TSS (*toxic shock syndrome*) :

- prima semnalare a acestei boli sistemice – 1978 — sindrom clinic : febra, hipotensiune, vertij de ortostatism, erytroderma, vomismente, diaree ;
- mai frecvent la femei si in special in perioada menstruatiei; astfel se explica asocierea care s-a facut cu utilizarea tampoanelor hiperabsorbante (prin scaderea locala a ionilor de Mg); ulterior s-au semnalat cazuri de TSS atât la femei, cât si la barbati, acest sindrom fiind considerat o complicatie a abceselor stafilococice, osteomielitei, ale infectiilor de plaga postchirurgicala si ale pneumoniilor postgripale;
- in 1981 s-a postulat ca TSS este determinat de toxine; au fost descrise 2 toxine:
  - exotoxina pirogenica tip C;
  - enterotoxina stafilococica F = toxina -1 TSS;
- ulterior s-a demonstrat ca TSS este determinat de urmatorii produsi metabolici:
  - **TSST-1** (s-a dovedit ca cele 2 toxine mentionate anterior sunt identice si sunt denumite acum astfel);
  - **enterotoxina stafilococica**;
  - **exfoliatine**;
  - acesti produsi sunt considerati a avea o activitate de **superantigene,** care determinina eliberarea de citokine (monokine, limfokine) si explica evolutia sistemica a sindromului socului toxic.

TSST (*Toxic Shock Syndrome Toxin)* = Toxina care determina sindromul de soc toxic, este considerata un **superantigen** produs in primul rând de anumite tulpini de *Staphylococcus*

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

aureus, ca si de anumite tulpini de *Streptococcus pyogenes*. Spre deosebire de antigenele obisnuite care activeaza una – câteva clone de limfocite Th, TSST activeaza un mare numar de limfocite Th. Aceasta toxina se leaga direct de moleculele CMH clasa II, fara a mai fi internalizata si prelucrata. Acest complex interactioneaza cu lantul β al receptorului T celular (Vβ al TCR) al multor celule Th, determinând activarea lor si eliberarea consecutiva unor mari cantitati a IL-2, ca si a IL-1 din macrofage. Aceste interleukine sunt responsabile de multe dintre simptomele socului toxic. TSST este de asemenea un mitogen al limfocitelor T, ceea ce determina o supraproductie de citokine. Enterotoxina stafilococica, care determina toxiinfectie alimentara, are un mod similar de actiune, dar actioneaza local la nivelul tractului intestinal si cauzeaza voma si diaree.

Diagnosticul de laborator al infectiilor stafilococice se face in urmatoarele etape (Anexe I-IV):

- recoltarea produselor patologice (de ex. exudat nazo-faringian) si izolarea in cultura pura a tulpinii stafilococice (fig. 55);
- examinarea caracterelor de cultura pe mediu lichid si solid;
- evidentierea pigmentogenezei;
- examenul microscopic al frotiurilor colorate prin metoda Gram (coci Gram pozitivi);
- testul hemolizei (culturi dezvoltate pe geloza-sânge) ;
- testul catalazei (prin aplicarea a 1 – 2 picaturi de H_2O_2 3%, pe cultura dezvoltata pe geloza simpla; interzis a se efectua testul pe geloza-sânge, testul putând fi fals pozitiv) ;
- testul coagulazei pe lama (se executa punând in contact o picatura de plasma si cultura stafilococica de testat, dezvoltata pe mediu solid - evidentiaza coagulaza legata = *clumping factor)* si in tub (se face un amestec de plasma si cultura dezvoltata in mediu lichid; se fac observatii la 30 min, 1, 2, 3 si 4 ore – testul evidentiaza coagulaza libera);
- testul termonucleazei (pe mediu cu ADN si albastru de toluidina – vezi Anexa IX), pentru evidentierea tulpinilor producatoare de enterotoxina (prin metoda difuziei in gel); enterotoxina stafilococica se numara printre cele mai termorezistente; perioada de incubare, de la ingerarea alimentelor contaminate cu stafilococi producatori de enterotoxina si eliminata in alimente in perioada de crestere bacteriana, pâna la manifestarile toxiinfectiei (diaree), este de 6 ore ; alimente si factori de risc: produse de carne, peste, lactate, creme, maioneze, diferite amestecuri (inclusiv salate), aciditatea gastrica scazuta, insuficienta tratare termica. Pragul de detectie al enterotoxinei si al DN-azei termostabile este de $10^5 – 10^6$ bacterii/ g aliment .
- teste biochimice (vezi anexa IV): testul de fermentare a manitolului; in jurul coloniilor de *S. aureus* care fermenteaza manitolul cu producere de acizi,, mediul vireaza din rosu in galben;
- sisteme biochimice microtest de identificare: *API Staph (BioMérieux); Vitek GPI Card (BioMérieux); MicroScan Pos Id Panel (Ca) ;*

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- Testarea sensibilitatii la antibiotice prin tehnica antibiogramei (vezi Cap. Diagnosticul microbiologic, fig. 59); sensibilitatea la novobiocina (caracter stabil, util identificarii) diferentiaza specia *S. epidermidis* de alte specii coagulazo-negative (*S. saprophyticus,* agent cauzal al infectiilor urinare, este rezistent la novobiocina);
- Tipizare fagica la nivelul Centrului de Referinta pentru Stafilococi (fig. 61).

Familia Streptococcaceae – Streptococcus sp.

Pe baza caracterelor fiziologice aceasta familie se diferentiaza in urmatoarele genuri:

1) Aerococcus sp. – cuprinde specii saprotrofe, prezente in aer, pe vegetale proaspete si conservate, in carne conservata; in general nepatogene pentru om, totusi sunt rar izolate din infectii urinare si endocardite. Ex. *A. viridans.*

2) *Gemella sp.* – cuprinde specii care se numara printre membrii microbiotei normale a tractului respirator superior (initial erau incluse intre neisserii, dar s-a observat ca au un perete celular foarte asemanator cu streptococaceele); bacterii conditionat- patogene, izolate din secretia bronsica si exudate faringiene, dar si din abcese, plagi, endocardite. Ex.: *G. haemolisans.*
- celulele acestor genuri sunt grupate in tetrade si pachete (si nu in lanturi);

3) *Leuconostoc sp.* – include specii care au fost considerate mult timp ca nepatogene pentru om, fiind izolate din fructe, vegetale si produse lactate; recent au fost izolate din meningite si septicemii. Ex. ***Leuconostoc mezenteroides.***

4) Pediococcus sp. – include specii prezente in materia vegetala aflata in descompunere fermentativa; participa la fermentarea berii - ex. *Pediococcus cerevisiae.*

5) ***Lactacoccus garviae***; ca si *Pediococcus sp.,* poate determina septicemii;

6) ***Streptococcus sp.*** – gen care grupeaza multe specii saprotrofe, patogene si conditionat-patogene, la om si animale.

Caractere generale ale streptococilor

Morfologie: coci Gram pozitivi, sferici, ovoizi, grupati in lanturi de lungime variabila; pe medii de cultura corespunzatoare lungimea lanturilor este mare, astfel ca la microscop, apar ca o retea (gr. *streptos* = impletit)

Caractere metabolice: aerobi facultativ anaerobi si strict anaerobi (*Peptostreptococcus*); fermenteaza glucoza cu producere numai de acid lactic (homofermentativi), catalazo-negativi si oxidazo-negativi; prin aceste caractere se diferentiaza de stafilococi, care sunt catalazo-pozitivi si oxidazo-negativi si de neisserii, coci Gram negativi, catalazo-pozitivi si oxidazo-pozitivi.

Clasificarea streptococilor se face in functie de mai multe criterii, astfel :

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

I) Dupa tipul de hemoliza:

- streptococii β-hemolitici – cuprind majoritatea speciilor patogene pentru om si animale; produc hemoliza clara in jurul coloniilor, datorita hemolizinei numita *streptolizina S (SLS);* acest tip de hemoliza este caracteristic streptococilor din grupele serologice A, B, C, G;
- streptococii α - hemolitici – produc o hemoliza cu nuanta verzuie in jurul coloniilor, dar dupa 24 ore se observa un inel de β-hemoliza; hemoliza α = tip *viridans* este caracteristica speciilor *S. viridans, Enterococcus faecalis (=S. faecalis), S. pneumoniae* ;
- streptococi care produc hemoliza α' - incompleta, cu aspect voalat, pe zonele de hemoliza aparând hematii nelizate; acest tip de hemoliza este caracteristic unor streptococi din grupele serologice B si D ;
- streptococii γ - nehemolitici, apartin grupului serologic D (fig. 12).

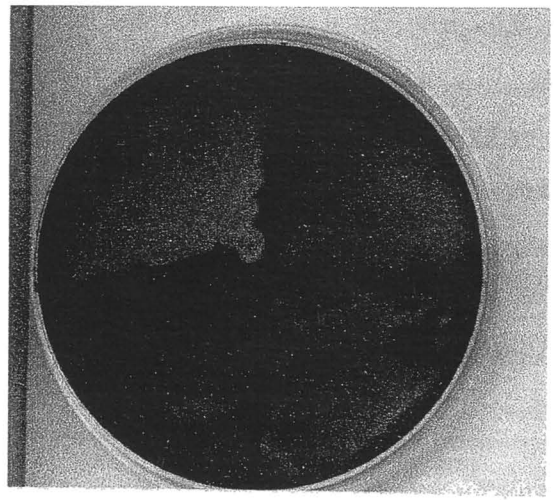


Fig. 12. Tipurile de hemoliza caracteristice streptococilor.

II) Dupa structura antigenica :

- clasificare inceputa din 1928 (Rebecca Lancefield), bazata pe specificitatea antigenica a unui antigen polizaharidic din peretele celular, denumit substanta C (carbohidrat streptococic) – grupele A, B, C, G, F, ca si pe baza acizilor teichoici (grupul D). In functie de aceste antigene, streptococii sunt impartiti in 18 grupe serologice, notate A – H si K – T. Streptococii tip *viridans* nu sunt inclusi in aceasta clasificare.

III) Dupa habitat si patogenie :

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- streptococi lactici - proveniti din vegetale, trec in lapte (grup serologic N); sunt folositi in industria fermentativa a laptelui;
- streptococi fecali - membri ai microbiotei intestinale normale la homeoterme, sunt conditionat patogeni ; de ex. *Enterococcus faecalis ;*
- streptococi orali – prezenti in microbiota mucoasei bucale (*S. viridans)* si la nivelul placii dentare (*S. mutans, S. sanguis, S. mitior, S. sobrinus)*; sunt conditionat patogeni, astfel ca patrunsi in circulatie pot determina endocardita ;.
- **streptococi piogeni** - prezenti in tractul respirator superior la om si animale; sunt patogeni, determinând imbolnaviri variate, acute si cronice si complicatii ale acestora ;
  - streptococi β - hemolitici – ex. *S. pyogenes* din grupul serologic A; specie sensibila la bacitracina, caracter util identificarii; coci grupati in lanturi (fig. 13) ;
  - Streptococi α - hemolitici ; sunt conditionat patogeni – ex. *S. pneumoniae* (pneumococul – grupare caracteristica - diplococi capsulati – fig. 14) este o specie sensibila la optochin, caracter util identificarii; poate determina pneumonii, bronhopneumonii, meningite cu caracter recidivant; substanta C reactioneaza cu proteina C–reactiva (CRP) si activeaza raspunsul imun nespecific;
  - streptococi din grupul serologic C :
    - *S. equisimilis* (specie izolata de la om)- β - hemolitic
    - *S. zooepidermicus* (specie izolata de la animale) - se transmite la om prin lapte nepasteurizat; ajuns in tractul respirator superior determina infectii la acest nivel, ca si glomerulonefrite acute post streptococice;
  - streptococi din grupul serologic B – *S. agalactiae* - specie prezenta la bovine, dar si in tractul genital feminin, de unde poate trece la nou-nascut la care poate determina imblonaviri grave, cu mortalitate mare (50%).
  - streptococi din grupul serologic G - β -hemolitici; frecvent implicati in patogenia glomerulonefritei.

Streptococcus pyogenes - Caractere de cultura si metabolice

- coci grupati in lanturi (fig. 13), care in produse patologice au capsula constituita din acid hialuronic, cu rol in virulenta acestei specii;
- pe geloza- sânge formeaza colonii cu caractere diferite:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- *mucoid - filante*; caracterul mucoid se datoreaza faptului ca germenii sunt capsulati chiar si in culturi tinere, când sunt izolati de la pacienti cu boli grave;
- *matt* - colonii turtite, margini regulate, cu tendinta de a conflua (~harti geografice) ; rezulta prin deshidratarea coloniilor mucoide, datorita hidrolizei acidului hialuronic de catre hialuronidaza streptococica;
- *glossy* – colonii rotunde, cu margini regulate, cu suprafata convexa, in centru formând un con lucios, vizibil la lupa;
- *rough* – colonii uscate, cu suprafata rugoasa (colonii R), cu margini crenelate, care se desprind usor de pe mediu.

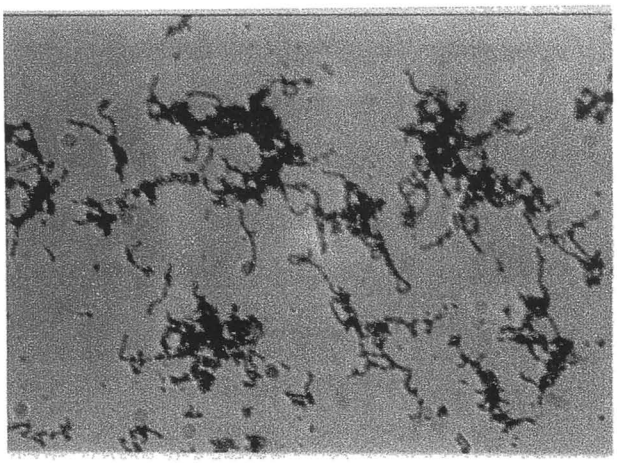


Fig. 13. Imagine la microscopul optic a unui preparat coloratGram, efectuat dintr-o cultura de *Streptococcus pyogenes* in care se observa coci dispusi in lanturi (marire : x 1500).

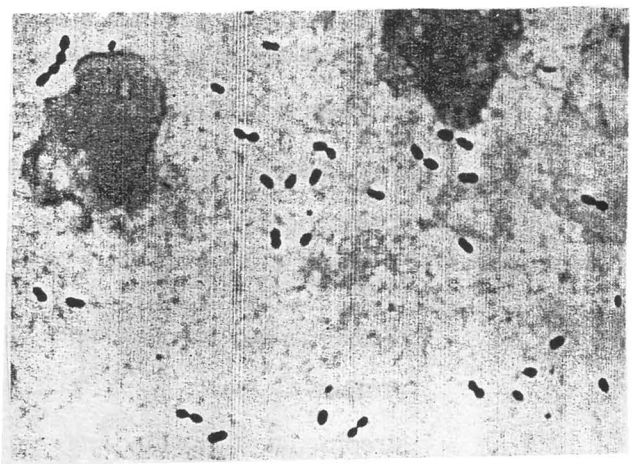


Fig. 14. Imagine la microscopul optic a unui preparat coloratGram, in care se observa diplococi de *Streptococcus pneumoniae,* capsulati (halou clar in jurul celulelor) (marire: x1500).

Aceasta specie necesita pentru crestere si multiplicare un mediu de cultura care contine factori nutritivi cum ar fi: aminoacizi, vitamine hidrosolubile si glucoza; se adauga sânge, ser de cal si lichid de ascita. Temperatura optima de crestere este de 37°C, pH–ul optim = 7,4 - 7,6. Pe medii de cultura lichide aspectul culturii variaza in functie de virulenta tulpinii cultivate: cultura cu aspect opac, cu depozit - tulpina virulenta; cultura cu aspect clar, cu depozit grunjos – tulpina nevirulenta.

Medii de cultura – lichide: bulion glucozat, bulion-ser, bulion-sânge, bulion-ascita;

- solide : geloza-sânge, geloza-ser.

Rezistenta la agenti fizici si chimici - mor repede in mediul extern, sub actiunea UV sau in conditii de uscaciune; mor prin expunere la 60°C timp de 1h; rezista 3 – 4 luni la 4°C; sunt

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

distrusi de fenol 2 – 5 %, sublimat, apa oxigenata, iod, penicilina (antibiotic de electie in tratamentul infectiilor determinate de aceasta specie).

I. Structuri de suprafata implicate in virulenta si antigenitate

1) Capsula – constituita din acid hialuronic ; reprezinta un factor de virulenta prin actiunea de mediere a aderentei streptococilor la substratul celular sensibil si prin efectul antifagocitar; este distrusa de hialuronidaza produsa de celula streptococica (in perioada târzie a fazei logaritmice de crestere) - poate fi evidentiata numai in produse patologice sau in culturi tinere de maximum 18 h.
2) Peretele celular – este compus din 3 straturi : un strat proteic extern, un strat polizaharidic mediu si un strat peptidoglicanic intern. La exteriorul peretelui celular sunt prezenti determinanti antigenici, cu rol in aderenta si antifagocitar: acizii teichoici si lipoteichoici.
3) Fimbriile – strabat capsula, au rol in virulenta prin actiunea de mediere a aderentei streptococilor la substratul celular sensibil si prin efectul antifagocitar.

Stratul parietal proteic

Proteina M. Determina specificitatea de tip; astflel, streptococii serogrupului A se impart in peste 80 tipuri serologice; anticorpii anti - M sunt specifici de tip si au rol protector (imunitate specifica de tip, nu incrucisata); au fost identificate 80 tipuri de Ac anti-M.

MAP (*M- associated protein*). Legata de proteina M se afla o fractie proteica MAP nespecifica de tip, greu de disociat de M, care determina reactii de hipersensibilitate si reactiile imunologice incrucisate, cu diferite tesuturi din organismul uman (fibra musculara cardiaca, membrana glomerulara, tesutul conjunctiv), conducând la complicatii ale infectiilor streptococice (cardita reumatismala, glomerulonefrita poststreptococica, reumatism articular acut). Proteina MAP este antigenica, dozarea Ac-lor indusi de aceasta proteina fiind utila in diagnosticul complicatiilor poststreptococice. Titrul acestor Ac creste in cursul infectiilor repetate si se mentine crescut chiar ani, ceea ce permite diagnosticul retrospectiv.

Proteina P nu are rol in virulenta; este antigenica si permite serotiparea streptococilor de grup A in serotipuri (T) in studii de epidemiologie.

SOF (factorul de serumopacitate) = o lipoproteinaza care opacifiaza mediul care contine ser de cal; este antigenica.

Stratul polizaharidic. In structura acestuia exista carbohidratul specific = substanta C = ACHO, care determina **specificitatea de grup**; este antigenica. Ac anti- ACHO apar tardiv intr-o infectie streptococica, titrul lor creste in infectii repetate si in complicatii poststreptococice (de ex. : in

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

cardita reumatismala se remarca un titru mare de Ac timp indelungat, deoarece exista o relatie de asemanare structurala intre polizaharidul C si glicoproteinele din valvula cardiaca).

II. Componente extracelulare eliberate de streptococi, cu rol in virulenta si antigenitate

1. **Enzime- hemolizine = streptolizine** : a) **SLO** – streptolizina O oxigen labila, activa in prezenta unui agent reducator; are efect citolitic, demonstrat experimental prin injectare i.v. la animale, la care are efect letal ; la om produce leziuni tisulare. Este puternic antigenica, inducând sinteza de Ac anti – SLO (ASLO); complexele Ag-Ac ASLO pot precipita in tesuturi, determinând fenomenul Arthus (reactie de hipersensibilitate) sau se depun in rinichi si membranele sinoviale, determinâd leziuni prin activarea sistemului complement. Dozarea Ac ASLO este utila diagnosticului si aprecierii eficientei tratamentului ; b) **SLS** – streptolizina S oxigen stabila, determina fenomenul de hemoliza *in vitro*, in jurul coloniilor de streptococi.

   Hialuronidaza- prezenta in culturi mai vechi de 4 ore; determina hidroliza acidului hialuronic capsular, dar si din tesutul conjunctiv al organismului infectat, fiind deci un factor de virulenta (agresina) care permeabilizeaza barierele epiteliale mucoase sau tisulare, favorizând astfel diseminarea streptococilor in organism; este antigenica.

   Streptokinaza = fibrinolizina – hidrolizeaza fibrinogenul, inhibând formarea barierelor de fibrina, cu care organismul incearca sa limiteze infectia (factor de invazie); este antigenica.

   Streptodornaza (dezoxiribonucleaza) – are un efect direct, de depolimerizare a moleculelor de ADN rezultate din degradarea leucocitelor si indirect, determinând consistenta vâscoasa a produselor patologice recoltate in cursul infectiilor supurative; este antigenica, iar rezultatele titrarii anticorpilor anti – DN-aza se coroboreaza cu celelalte rezultate.

   Proteinaza, impreuna cu mecanismele complexe de patogenitate bazate pe reactii imunologice incrucisate si fenomene de autoagresiune (datorate antigenelor heterofile prezente la specia *Streptococcus pyogenes* si la specia umana), contribuie la instalarea complicatiilor poststreptococice nesupurative.

2. **Toxine** – toxina eritrogena (scarlatinoasa = toxina Dick); este produsa si eliberata de streptococii grupului serologic A si implicata in eruptia cutanata caracteristica tabloului clinic al scarlatinei ; este produsa si de streptococi apartinând serogrupelor C si G. Sinteza acestei toxine este codificata de fagi temperati si deci realizata de tulpini lizogene de streptococi. Este de natura proteica si se disting 3 tipuri (A - mai frecvent, B si C); toate tipurile sunt antigenice, iar Ac

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

neutralizanti anti-toxina eritrogena confera imunitate organismului pentru toata viata. Toxina eritrogena produsa de *Streptococcus pyogenes*, are un mecanism de actiune similar cu cel al TSST, actionând ca un *superantigen.* Tulpinile bacteriene nelizogene nu pot determina scarlatina, dar pot fi agent cauzal al faringitelor si amigdalitelor.

Patogenia streptococilor. Varietatea mare a factorilor de virulenta determina si spectrul larg de imbolnaviri, care difera dupa poarta de intrare in organism a agentilor patogeni:

- cai respiratorii – infectii acute eruptive – scarlatina
  -infectii neeruptive – angina streptococica- eritematoasa sau pultacee;
- cale cutanata -infectii cutanate – impetigo (adesea ca infectie mixta strepto-stafilococica) = bube dulci (o forma de piodermita la copii);
  -intertrigo (pustule intre degete); erizipel; infectii de plaga;
- cale genitala - infectii la nivelul aparatului genital feminin - endometrite;

In cazul netratarii acestor infectii, pot evolua catre:

- complicatii supurative: otite, sinuzite, mastoidite, adenite, pneumonii, bronhopneumonii, flegmoane, flebite, celulite, meningite, septicemii, sindrom asemanator soculul toxic (*Toxic Shock like – Syndrome = TS like-S);*
- complicatii tardive nesupurative: reumatism articular acut, glomerulonefrita post streptococica; eritem nodos, coree – la 14 – 20 de zile dupa o infectie netratata.

Imunitatea in infectiile streptococice:

1. Raspunsul imun mediat umoral – efectorii acestui tip de raspuns sunt anticorpii sintetizati de organismul infectat, fata de: a) componente endocelulare si b) extracelulare ale streptococilor, ca si fata de c) componente proprii organismului infectat (autoanticorpi).

a) - **anticorpi anti-M, anti-MAP** (apar tardiv in cursul infectiei), **anti- ACHO** ;

b) - **anticorpi anti-SLO (ASLO)**, bine studiati, care apar repede dupa infectie (spre deosebire de anti-M si anti-MAP), inregistreaza un titru maxim la 2 saptamâni dupa infectie, cu o zona de platou pâna la 6 saptamâni si un titru bazal dupa 2 luni) ;

- rezultatele titrarii ASLO se coroboreaza cu datele clinice si cu rezultatele dozarii altor anticorpi (de ex. cu anticorpii anti-MAP) ;
- un titru ASLO fals (+) se poate datora unor infectii asociate: TBC, hepatita, nefroze – cazuri in care sunt prezente in ser si β - globuline, care neutralizeaza nespecific SLO, astfel ca se impune tratarea serului cu solutie de rivanol 0,4 %, pentru indepartarea inhibitorilor nespecifici) ;
- o reactie fals (-) la testul ASLO este posibila atunci când serul de cercetat este infectat

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

cu *Bacillus subtilis* sau *Pseudomonas sp.*, bacterii strict aerobe care in timpul cresterii produc metaboliti cu efect de inactivare (nespecifica) a SLO ;

- **anticorpi anti-DN-aza,** prezinta titruri mari in infectii cutanate si in glomerulonefrita poststreptococica;
- **anticorpi anti- eritrotoxina** – se evidentiaza printr-o reactie (I.D.R.) *in vivo* - se injecteaza 0,1 ml de toxina pe fata anterioara a antebratului ; daca exista Ac anti-toxina Dick, acestia vor neutraliza toxina si nu apare roseata (reactie pozitiva); in cazul unei reactii negative pentru prezenta anticorpilor apare o papula rosie, dura, la locul injectarii; interpretare: ϕ papulei > 10mm $\Rightarrow$ scarlatina

c) **autoanticorpi** – evidentierea lor este importanta in aprecierea evolutiei complicatiilor poststreptococice.

Raspunsul imun celular este evaluat prin teste in *vitro* si *in vivo* :

- teste *in vitro* : - testul transformarii limfoblastice ;
  - testul inhibitiei macrofagelor ;
- teste *in vivo* – test de hipersensensibilitate - prin injectare de antigene streptococice (corpusculare, SLO) - in caz de reactie pozitiva se observa o inflamatie (roseata).

Streptococcus agalactiae - grup serologic B

– agent patogen care determina mastita bovina si astfel poate trece in secretia lactata, putând sa infecteze omul, in caz de consum de lapte nepasteurizat ; prezent si la ~ 25% dintre femei care sunt purtatoare ale acestui agent patogen in faringe, intestin sau vagin si pe care il pot transmite la nou-nascut in timpul nasterii ;

- la nou-nascut determina infectii respiratorii grave, meningite (1/3 din cazuri, alte 1/3 din cazuri fiind determinate de *E. coli*), septicemie neonatala ; transmiterea agentului patogen se face de la mama sau de la purtatori faringieni din spital ; infectiile produse au o mortalitate mare (50%);
- la femeia gravida poate determina: avort spontan, nastere prematura, febra puerperala, septicemii; dupa nastere, femeia prezinta bacteriurie ;
- la pacienti imunosupresati sau cu imunodeficiente poate determina infectii urinare, ale plagilor, ale articulatiilor, osteomielite, pneumonii, abcese periamigdaliene endocardite.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Caractere de cultura si metabolice

S. agalactiae se caracterizeaza prin tipul de hemoliza α'- incompleta , pigmentogeneza pe mediu Columbia (pigment rosu caramiziu), cresterea pe medii cu concentratii mari de bila.
Nu hidrolizeaza esculina la esculetina (spre deosebire de streptococii de grup D – *Enterococcus. faecalis, S. bovis).* Alte caractere diferentiale : rezistenta la bacitracina si SXT.

Enterococcus faecalis – grup serologic D. Enterococii sunt bacterii Gram pozitive care apartin genului *Enterococcus sp.* si fac parte din microbiota intestinala normala. Inainte de identificarea tulpinilor de enterococi multirezistente la antibiotice la sfârsitul anilor '70, enterococii erau considerati bacterii relativ inofensive. Dupa doua decenii, enterococii au fost identificati ca agenti ai infectiilor nosocomiale, cu o frecventa in crestere si in paralel cu o dobândire a rezistentei la majoritatea substantelor antibiotice utilizate (in ultimul deceniu lumea medicala a fost alarmata de emergenta enterococilor rezistenti la vancomicina), ceea ce restrânge mult optiunile medicilor clinicieni pentru conducerea tratamentului infectiilor determinate de acestia. Ca rezultat, enterococii au devenit agenti oportunisti, cauza unor infectii dificil de tratat. Majoritatea infectiilor se datoreaza mai ales speciilor de *Enterococcus faecalis* si in mai mica masura altor specii, cum ar fi : *E. faecium, E. gallinarum, E raffinosus, E. avium.* Raportul dintre infectiile determinate de *E. faecalis* si cele cauzate de alte specii de enterococi este de 10:1. In plus, experimentele de conjugare au confirmat transferul genelor de rezistenta la vancomicina, de la enterococi la *S. aureus. R*ezultatele modeste obtinute in ultimul deceniu in prevenirea si controlul strategiilor pentru limitarea rezistentei la vancomicina (ca si a rezistentei la meticilina la stafilococi), au reliefat dificultatea problemei, odata aparuta.

Diagnosticul de laborator al infectiilor streptococice

- bacteriologic :

- se bazeaza pe izolarea agentului patogen din produsele patologice si examinarea unor caractere de cultura, morfologice si biochimice (vezi Anexe I- IV) :
  - examinarea caracterelor de cultura pe medii lichide si solide ; pe geloza-sânge se determina caracterele de colonie si tipul de hemoliza;
  - examenul microscopic al frotiurilor efectuate din culturi pe mediu lichid, colorate Gram : bacterii Gram pozitive, grupate in lanturi, ;
  - testul catalazei – efectuat pe lama sau in tub (nu se face pe culturi in placi cu geloza-sânge);

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- testul cresterii pe medii cu 6,5% NaCl - util identificarii enterococilor care sunt halotoleranti *(E. faecalis)* ; celelalte specii de streptococi nu cresc pe acest mediu ;
- testele diferentiale de sensibilitate la bacitracina si SXT (sulfametoxazol trimetoprim) – streptococii β -hemolitici din grupul serologic A sunt sensibili la bacitracina (ϕ zonei de inhibitie a cresterii > 10 mm) si rezistenti la SXT, iar cei din serogrupele C, F, G sunt rezistenti la bacitracina (rezistenta nativa) si sensibili la SXT;
- testul la optochin – *S. pneumoniae* este sensibil la optochin care determina o zona de inhibitie a cresterii > 14 mm ;
- tehnici moderne: galerii de identificare biochimica tip API (BioMérieux) - API 20 Strep, Rapid ID 32 Strep System (disponibile si in tara noastra); metode moleculare.

- imunologic :

- reactii de latex – aglutinare ;
- determinarea serogrupului cu ajutorul trusei Streptic ABCG (produsa de I. Cantacuzino) sau cu *Slidex Strep kit* (BioMérieux);
- testul ASLO (titru semnificativ > 200 U.H.)
- teste imunoenzimatice (ELISA).

S. agalactiae (grup serologic B)

- hemoliza α'- incompleta - testul CAMP- de evidentiere a *CAMP-factorului* (proteic)- realizat prin insamântarea in striuri perpendiculare a tulpinii de streptococ de testat si a unei tulpini de stafilococ producator de β- toxina (hemoliza cald-rece) ; streptolizina actioneaza sinergic cu β-hemolizina stafilococica (hemoliza incompleta) si determina o hemoliza totala in forma de sageata (fig. 15).

- pigmentogeneza- insamântare pe geloza Columbia -colonii pigmentate in rosu-caramiziu ;

- cresterea pe medii cu concentratii mari de bila ;
- testul hidrolizei esculinei - nu hidrolizeaza esculina la esculetina (spre deosebire de streptococii de grup D – *S. bovis)* – esculina + Fe din mediu – determina innegrirea coloniilor si a mediului de cultura in jurul lor ;
- testarea sensibilitatii la antibiotice : rezistenta la bacitracina si SXT.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

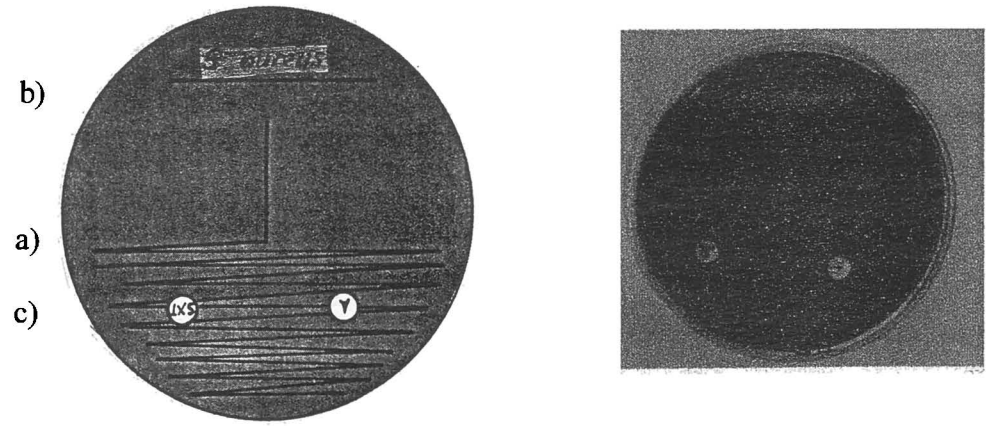


Fig. 15. A. Tehnica de insamântare a gelozei-sânge pentru realizarea testului CAMP si a testelor de sensibilitate la bacitracina si SXT (sulfametoxazol trimetoprim); a) tulpina de testat este insamântata cu ansa in striuri in zig-zag (pe ~ 40% din suprafata placii), care se termina intr-un striu unic care coboara; b) perpendicular pe acest striu al tulpinii de testat, se insamânteaza in striu unic, de asemenea, o tulpina de *Staphylococcus aureus,* distanta dintre cele doua striuri trebuind sa fie de 1 cm; c) pe suprafata insamântata in striuri in zig-zag cu tulpina de testat, se plaseaza discuri diferentiale de bacitracina si SXT.
B. Test CAMP pozitiv, caracteristic speciei *Streptococcus agalactiae*, care produce o zona de hemoliza totala in forma de sageata, la zona de intâlnire a striului pe care a fost insamântata, cu striul pe care s-a insamântat *S. aureus*.

BACILI GRAM POZITIVI

Dintre genurile de bacili Gram pozitivi, patru genuri sunt importante din punct de vedere medical:

Bacillus sp. - bacili formatori de spori

Clostridium sp. - " " " (Va fi tratat in capitolul "Bacterii anaerobe")

Corynebacterium sp. – bacili neformatori de spori

Listeria sp. - " " "

Bacillus sp.

Dintre speciile acestui gen, doua specii sunt mai importante din punct de vedere medical: *B anthracis si B. cereus* (in mai mica masura si specia *B. subtilis,* care poate fi un contaminant al culturilor si care poate determina bacteriemie tranzitorie la pacientii care fac hemodializa, situatie care poate sa apara datorita contaminarii aparatului cu care se realizeaza aceasta procedura).

Bacillus anthracis este agentul patogen al unei boli grave, mortale, numita antrax (carbune sau dalac), bola comuna la animale si rara la om. Este un bacil Gram pozitiv de dimensiuni mari, cu capete drepte, celulele fiind grupate adesea in lanturi (fig. 16). Sunt germeni

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

imobili (spre deosebire de celelalte specii ale genului), capsulati, capsula fiind compusa din D-glutamat (caracter unic printre bacterii) si având un puternic efect antifagocitar.

Se transmite prin spori, care rezista in sol ani de zile. Omul se poate infecta prin spori sau produse animale (piele, blana, lâna) sau prin contact cu animale bolnave. Poarta de intrare in organismul gazdei poate fi reprezentata de piele, mucoase si tractul respirator.

Patogenie. *Bacillus anthracis* este o bacterie foarte agresiva, care are un efect letal prin capacitatea mare de multiplicare si formarea de trombusuri ce astupa capilarele, determinând fenomene de hipoxie, ischemie si necroza tisulara, dar si prin toxinogeneza.

Agentul patogen invadeaza gazda si produce toxina specifica, cu trei componente: 1) factorul "edem", 2) antigenul protector si 3) factorul letal. Factorul "edem" este o adenilat-ciclaza care necesita factor protector pentru a patrunde in celulele umane. Adenilat-ciclaza bacteriana creste concentratia de AMPc in celula, determinând pierderea ionilor de clor si a apei si aparitia edemului in tesuturi. Factorul letal este o proteaza care cliveaza o fosfokinaza necesara pentru transmiterea semnalului in calea care controleaza cresterea celulara. Pierderea fosfokinazei conduce la inhibarea cresterii si moartea celulara consecutiva. Leziunea tipica este o ulceratie neagra, cu crusta, numita "pustula maligna". Cazurile netratate evolueaza spre bacteriemie si moarte. Antraxul pulmonar este o forma de pneumonie cauzata de inhalarea sporilor de catre lucratori din industria de prelucrare a lânii. Antraxul gastrointestinal se produce ca rezultat al ingerarii de carne contaminata.

Diagnosticul de laborator. Examenul microscopic al produsului patologic. Pe frotiuri efectuate din leziuni se observa bacili de dimensiuni mari, Gram pozitivi, grupati in lanturi. De obicei, sporii nu pot fi observati pe frotiurile efectuate din produsul patologic. Bacilii pot fi cultivati in conditii aerobe, pe geloza nutritiva sau pegeloza-sânge ; formeaza colonii de tip "R", opace, cu margini ondulate. Pe mediu cu gelatina are o crestere arborescenta.

Pentru identificarea acestui agent patogen nu sunt utile testele serologice.

Penicilina G este antibioticul de electie in tratament. Nu au fost izolate tulpini rezistente .

Prevenirea contaminarii solului se face prin sterilizarea animalelor moarte si a produselor animale din zonele cu infectii endemice.

Bacillus cereus

Bacillus cereus este un bacil Gram pozitiv, celulele cu capete rotunjite fiind grupate in lanturi (fig. 17). Este un bacil formator de spori, care poate determina o intoxicatie alimentara cu doua forme distincte, ambele datorate enterotoxinelor produse. Prima forma este cea a unui sindrom diareic cu o perioada de incubare lunga - 18 ore si se manifesta prin diaree apoasa,

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

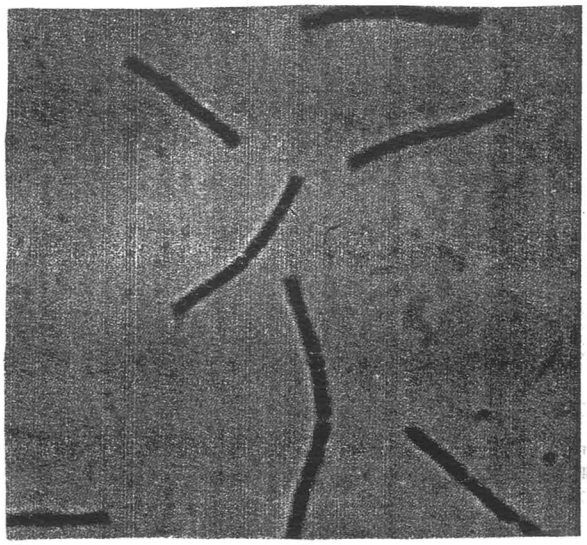


Fig. 16. *Bacillus anthracis* izolat dintr-o plaga a piciorului. Bacili Gram pozitivi, cu capete taiate drept, grupati in lanturi scurte (marire: x 1000).

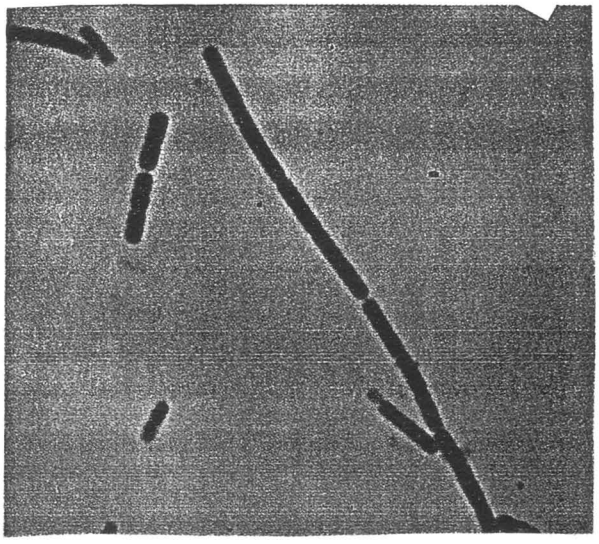


Fig. 17.*Bacillus cereus* izolat dintr-o plaga a gambei. Bacili Gram pozitivi, cu capete taiate drept, grupati in lanturi (marire : 1000X).

nesanguinolenta si dureri abdominale, semanând cu gastroenterita clostridiana. Cealalta forma este cea a unui sindrom emetic, cu o perioada de incubare scurta – 4 ore si se manifesta prin greata si vomismente substantiale (asemanator cu efectele enterotoxinei stafilococice), frecvent asociate cu consumul de orez (fiert sau copt). In ambele forme nu este prezenta febra si in majoritatea cazurilor se produce vindecarea spontana in 2 zile. Intoxicatia se datoreaza unei contaminari masive (1 milion de germeni/g produs) a alimentelor (orez, paste fainoase) cu spori de *Bacillus cereus*, termorezistenti.

Sporii de pe semintele cerealelor, cum ar fi orezul mai ales, supravietuiesc tratamentului termic rapid. Sporii germineaza când alimentele sunt pastrate calde timp de mai multe ore. In aceste conditii, celulele vegetative produc toxine, care vor patrunde in tractul digestiv al gazdei care ingereaza alimentul respectiv. *B. cereus* sintetizeaza 2 enterotoxine. Modul de actiune al enterotoxinei care determina forma diareica de intoxicatie este similar cu cel al toxinei holerice. Mai precis, toxina actioneaza prin ADP-ribozilare asupra proteinei G, care stimuleaza adenilat ciclaza si determina cresterea concentratiei de AMPc in enterocite. Modul de actiune al celeilalte enterotoxine – care determina forma emetica este asemanator cu modul de actiune al enterotoxinei stafilococice, având deci activitate de "superantigen" (vezi enterotoxina stafilococica).

Diagnosticul de laborator de obicei nu se face. Tratamentul este doar simptomatic, iar prevenirea nu se face prin metode specifice, ci prin evitarea consumului de alimente (orez fiert sau copt in special) pastrate mult timp la cald, care pot contine enterotoxine.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Corynebacterium sp.

Bacteriile incadrate in acest gen sunt bacili Gram pozitivi, neacidoalcoolorezistenti, neramificati, imobili (cu exceptia *C. aquaticum*), aerobi si facultativ anaerobi, neacidorezistenti; majoritatea speciilor fermenteaza glucoza si alte zaharuri si sunt catalazo-pozitive. Sunt bacili nesporulati, necapsulati, frecvent nehemolitici.

In editia din 1986 a manualul Bergey, Genul *Corynebacterium* era prezentat ca un grup heterogen de bacterii, care necesita revizuire.

In ultimul deceniu, taxonomistii au redefinit genul *Corynebacterium* pentru a-l restrânge la specii cu anumite particularitati: prezinta un perete celular apartinând chemotipului IV, in structura caruia este prezent acidul mezodiaminopimelic (*mezo - DAP*), arabinoza, galactoza, manoza, acizi micolici (cu lanturi continând intre 22 si 36 atomi de carbon, numiti si *acizi corinomicolici*), acizi grasi saturati si mononesaturati, menachinone dehidrogenate (o forma de vitamina K bacteriana) si care au un continut in G - C de ~ 51 – 68 moli %. Prezenta acizilor micolici demonstreaza inrudirea genului *Corynebacterium* cu genurile *Mycobacterium, Nocardia (*din grupul actinomicetelor*),* deosebirile constând in numarul diferit al atomilor de carbon din lanturile acizilor micolici. Genul contine anumite specii care nu corespund noilor criterii, fiind necesara reclasificarea lor.

Rezultate ale studiilor filogenetice bazate pe analiza secventelor ADN pentru moleculele de ARNr 16S, au demonstrat ca genul *Corynebacterium* este inrudit cu urmatoarele genuri, importante din punct de vedere medical: *Mycobacterium, Nocardia, Rhodococcus* si s-a sugerat incadrarea lui in Fam. *Mycobacteriaceae* si reclasificarea anumitor specii:

Corynebacterium haemolyticum ⇒ Arcanobacterium haemolyticum;

Corynebacterium pyogenes ⇒ Actinomyces pyogenes;

Corynebacterium equi ⇒ Rhodococcus equi;

Corynebacterium minutissimum – organism din grupul CDC-JK ⇒ *C. jeikeium.*

Clasificarea corinebacteriilor dupa habitat si patogenitate:

- specii patogene pentru om si animale;
- specii patogene pentru plante;
- specii nepatogene.

Semnificatie medicala. Specia tip a genului, patogena pentru om este *Corynebacterium diphteriae* care determina *difteria*, boala infecto-contagioasa, din grupul A (cu gravitate mare). Alte specii patogene: *C. minutissimum* – agentul patogen al eritrasmei pielii (dermatoza); *C. mycoides* – determina ulcere ale pielii, in zonele tropicale;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Difteria este cunoscuta inca din antichitate ca o boala a gâtului transmisibila la copii, dar a fost descrisa pentru prima data ca entitate clinica in 1826, de catre patologul Pierre F. Bretonneau, care a denumit boala "difterita", termen derivat de la cel grecesc pentru "membrana", fiind o referire la membranele care apar in gâtul pacientului. In 1883, Edwin Klebs a observat bacteria in materialul recoltat din gâtul unui pacient. In anul urmator, Fr. Löffler a cultivat pentru prima data bacteria pe ser bovin coagulat, folosit si azi pentru culturile stoc. Löffler a reprodus experimental boala, dar nu a descoperit agentul patogen in leziuni. A tras astfel concluzia ca boala nu este determinata de agentul patogen direct, ci de un produs de secretie al acestuia, ceea ce a fost confirmat ulterior de catre Roux, care a demonstrat ca filtratul culturii bacteriene determina leziunile caracteristice bolii, care este o toxemie. Bacilul numit initial Klebs – Löffler (*Bacillus diphtericum*) a primit in 1896 (Leman si Newman) numele stiintific de *Corynebacterium diphteriae,* deoarece gruparile de celule se aseamana unui "club" (gr. *coryne* = club) si formeaza membrane.

Corynebacterium diphteriae se prezinta sub forma unor bacili drepti sau incurbati, cu dimensiuni de 0,3 – 0,8 μm / 3 – 8 μm, frecvent maciucati sau in forme ovoide, cocoidale (mai ales când frotiul se face de pe geloza-sânge), neomogen colorate. Sunt bacterii Gram pozitive (la limita) care contin numeroase granule metacromatice citoplasmatice evidentiate printr-o coloratie speciala (pentru incluzii de volutina). Bacteriile ramân aproape unele de altele dupa multiplicare, dispuse in unghiuri ascutite (~ litere chinezesti) sau sub forma de palisade (fig. 18). Aceste caractere tinctoriale si morfologice sunt patognomonice, fiind utile identificarii.

Agentul patogen se transmite pe cale aerogena, prin inhalare de picaturi Pflügge eliminate de bolnavi de difterie. Infectia se localizeaza in tractul respirator superior, in vecinatatea amigdalelor. *C. diphteriae* este tipul de agent patogen cantonat la poarta de intrare: – in falsele membrane, când poarta de intrare este rinofaringele; in secretia oculara – in difteria oculara; in secretia vulvara – in difteria genitala. La animale – câini, pisici – care sunt purtatori naturali ai agentului patogen, nu s-au citat cazuri de difterie.

Bacteriile produc o exotoxina puternica (dupa toxina botulinica si tetanica) care interfera cu sinteza proteica in celulele epiteliale care marginesc pielea si cavitatile corpului, inclusiv tractul respirator. Tesutul mort si mucusul se acumuleaza, impreuna cu leucocite, material fibros, formând pseudomembrane ("pseudo" pentru ca nu corespund definitiei unei membrane adevarate). Se produce blocajul respirator (asfixia), febra, adenopatie si moartea poate surveni, mai ales la copii; la adulti, adesea toxina difuzeaza pe cale circulatorie in organism, determinând leziuni cardiace si distructia invelisului gras din jurul nervilor. In 1929 Ramon a obtinut anatoxina difterica, supunând toxina actiunii combinate a formolului si caldurii. Anatoxina este folosita si in prezent pentru a realiza

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

profilaxia difteriei, prin vaccinare (cu trivaccinul DiTePer la vârsta de 3 ani; se face un rapel la 4 si 6 ani cu bivaccinul DiTe; monovaccinul ADPA se administreaza dupa 16 ani, la cei scapati de la vaccinarea din copilarie). In 1961, V. J. Freeman a descoperit un virus integrat in cromozomul bacterian, care codifica producerea exotoxinei, virus numit "corinefag " si care se afla in relatie de lizogenie cu bacteria gazda. Tulpinile bacteriene nelizogene nu sunt virulente, dar pot deveni ca urmare a infectiei virale.

Specii patogene la animale: *C. pseudotuberculosis (ovis), C. ulcerans, C. equi* – aceste specii pot deveni patogene pentru om (datorita toxinelor produse), fiind specii oportuniste la bolnavii de SIDA. *C. ulcerans,* un patogen obisnuit al bovinelor, poate da faringita exudativa sau ulcere ale mâinilor la om. Exista si cazuri de difterie, pentru ca produce doua toxine, una fiind asemanatoare cu toxina difterica, iar cealalta cu toxina produsa de *C. ovis;* aceasta specie poate determina la om limfadenita granulomatoasa acuta si pneumopatii cu eozinofilie. Nu sunt citate cazuri de difterie cu *C. ovis.*

Corinebacteriile nepatogene, numite difteromorfi, au o morfologie si caractere tinctoriale asemanatoare cu bacilul difteric . Pot fi incriminate in infectiile oportuniste, la bolnavii de SIDA. *C. hoffmani* este specie prezenta in microbiota normala a rinofaringelui, putând fi agentul cauzal al unor infectii urinare la bolnavii cu transplant renal sau al unor endocardite postchirurgicale, dupa operatii pe valvulele cardiace. *C. xerosis* este un difteromorf al rinofaringelui si pielii si un posibil agent cauzal al pneumoniei la bolnavii neoplazici. Difteromorfii prezenti pe tegumente (grupul JK) constituie cauza a 20 – 30 % din infectiile nosocomiale. Este foarte importanta diferentierea si diagnosticul corect.

Caractere de sensibilitate. Bacilul difteric este sensibil la caldura umeda, fiind omorât in 10 minute, la 60°C; este mai rezistent la uscaciune, in intuneric (asa se pastreaza tulpinile stoc, pe mediul Löffler). Rezista 5 zile in lapte, luni de zile pe obiecte contaminate, cu pastrarea caracterului patogen. Este sensibil la antibioticele uzuale (eritromicina, penicilina), mai putin sensibil la oxacilina; este distrus de antiseptice uzuale.

Tratamentul difteriei necesita atât antibiotice, cât si antitoxina pentru a neutraliza toxina. In prezent, boala este tinuta sub control, cazurile de difterie fiind sporadice : in S.U.A. – se inregistrează ~10-12 cazuri anual, dar ramâne o problema de sanatate in Asia; in Europa se inregistreaza un numar de aproximativ 800 – 900 cazuri anual, majoritatea in fostele tari ale Uniunii Sovietice si Turcia; de exemplu, in 1995 in 13 din cele 14 tari ale U.S. s-au inregistrat 50.000 imbolnaviri, dintre care 200 mortale. La noi in tara incidenta de 1 – 2 cazuri /an se datoreaza greselilor de vaccinare sau apar colectivitati mari cu copii scapati de la vaccinare. Desi se tinde spre eradicarea acestei bo

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

cunostintele despre aceasta boala sunt necesare, pentru recunoasterea ei in teren si diagnosticul de laborator.

Diagnosticul de laborator

- diagnostic bacteriologic

Izolarea germenului in stare pura de la purtatorii de tulpini toxigene trebuie sa fie urmata obligatoriu de sterilizarea focarului. Tulpinile izolate se identifica pe baza caracterelor morfotinctoriale, culturale, biochimice:

- efectuarea de frotiuri care se coloreaza Gram; examinarea la microscopul optic cu obiectivul de imersie permite observarea de : 1) *corinebacterii* - bacili Gram pozitivi (la limita), frecvent maciucati sau in forme ovoid-cocoidale (mai ales când frotiul se face de pe geloza-sânge), neomogen colorati; sunt bacterii care contin incluzii metacromatice citoplasmatice evidentiate prin coloratia speciala pentru incluzii de volutina ; bacteriile pot fi grupate in palisade sau dispuse in unghiuri ascutite (~ litere chinezesti) (fig. 18); aceste caractere tinctoriale si morfologice sunt patognomonice, fiind utile identificarii ; 2) *difteromorfi* - se observa bacterii Gram pozitive, filamentoase, ramificate, care dovedesc apartenenta la grupul actinomicetelor (fig. 19).

- genul *Corynebacterium* cuprinde specii care difera prin caracterele biochimice, cum ar fi: lichefierea serului bovin coagulat (mediu Loffler), lichefierea gelatinei, hidroliza esculinei;
- speciile *C. diphteriae, C. ovis, C. ulcerans* produc cistinaza si elibereaza H_2S- difteromorfii nu produc; identificarea biochimica se poate face cu ajutorul sistemului *API Coryne.*
- *C. diphteriae* nu produce ureaza ; *C. ulcerans, C. ovis* sunt ureazo-pozitive; difteromorfii +/- ;
- teste de fermentare a zaharurilor, teste de patogenitate.

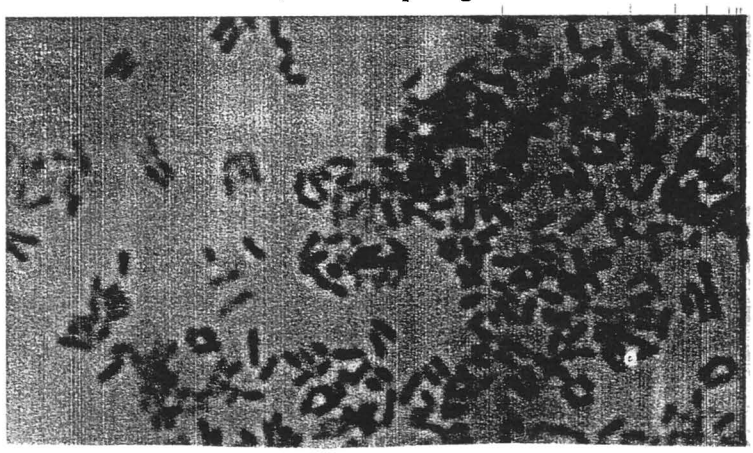


Fig. 18. Imagine microscopica a unor celule de*Corynebacterium sp.* pe frotiu colorat Gram in care se observa bacili Gram pozitivi, grupati in palisade (marire: x2500).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- diagnostic imunologic

- prin hemaglutinare pasiva (H.A.P.), test care permite si evaluarea nivelului seroprotectiei postvaccinale;

- **tipizarea fagica** si cu ajutorul **bacteriocinelor,** a tulpinilor izolate;

- determinarea sensibilitatii la antibiotice prin tehnica antibiogramei.

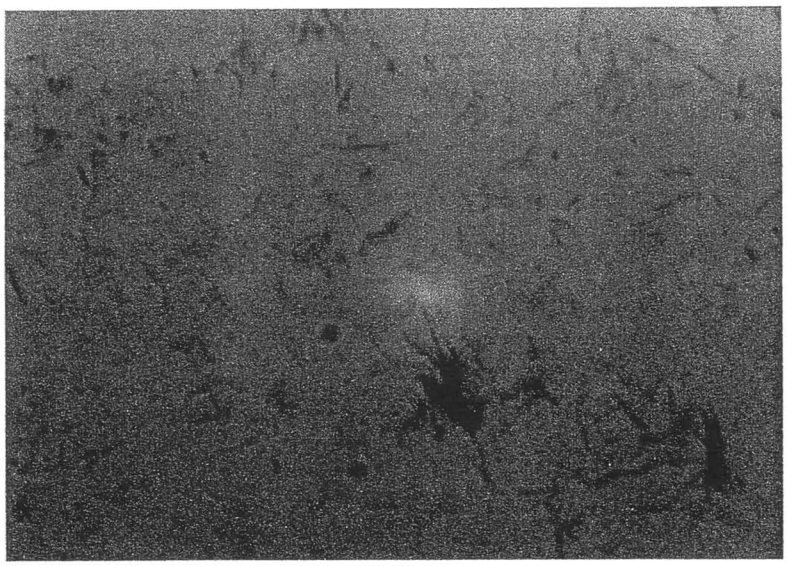


Fig. 19. Imagine la microscopul optic al difteromorfilor; se observa bacterii filamentoase, ramificate, care dovedesc apartenenta la grupul actinomicetelor (marire: x 2500).

Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes este un bacil de dimensiuni mici, Gram pozitiv. Intr-o perioada aceasta bacterie era considerata „Cenusareasa" bacteriilor patogene, datorita faptului ca proprietatile sale de patogenitate nu erau unanim recunoscute. Acest bacil este prezent in mod obisnuit in sol, ca si in microbiota multor animale, intre care bovine, rozatoare si animale de casa cu blana. Se transmite omului prin contact cu solul, ca si prin consum de alimente de origine animala, dar mai ales de brânzeturi.

Bacilii sunt grupati in literele "V" sau "L", asemanatoari corinebacteriilor (fig. 20). Sunt neobisnuit de mobili, prin miscari de rostogolire, ceea ce-i deosebeste de corinebacterii, care sunt imobile. Coloniile dezvoltate pe geloza-sânge sunt inconjurate de o zona ingusta de β-hemoliza, asemanatoare cu cea produsa unii streptococi. Este agentul patogen al meningitei si septicemiei la nou-nascuti si adulti imunocompromisi. Poate determina si gastroenterite febrile.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Patogenie. Listerioza poate avea mai multe forme:

- Meningita listerica - se caracterizeaza prin cefalee, rigiditatea gâtului, delir si coma;
- Listerioza sistemica - se insoteste de un numar mare de *monocite* in sângele periferic (de unde deriva denumirea speciei);
- Infectia uterului, insotita de discrete simptome *influenza-like*; daca infectia este contractata in timpul sarcinii, boala poate determina avort spontan sau tulburarii ale dezvoltarii mentale la nou-nascut.

Infectiile cu *Listeria* se produc mai ales in doua moduri: 1) infectii ale fatului sau ale nou-nascutului, datorita transmiterii transplacentare sau in timpul nasterii a agentului patogen; 2) infectii ale adultilor imunocompromisi, in special ale pacientilor cu transplant de rinichi. Listeriile sunt prezente la animale, plante, sol. Din aceste rezervoare de infectie, listeriile sunt trasmise omului prin contactul cu animale si excretele lor, prin lapte nepasteurizat si vegetale contaminate. Caracterul patogen al listeriilor este dependent de capacitatea acestor bacterii de a invada fagocitele mononucleare. Deoarece cresc preferential intracelular, imunitatea mediata celular este mai importanta in aceste infectii decât cea mediata umoral. Astfel, supresia imunitatii mediate celular predispune la infectii cu listerii. Infectia cu *L. monocytogenes* se propaga de la o celula la alta prin intermediul filamentelor de actina , care se contracta si propulseaza bacteria prin membrana, spre celula invecinata. Un factor important de virulenta este *listeriolizina O*, o citolizina/ hemolizina similara streptolizinei O, care actioneaza prin degradarea membranelor celulare.

Infectiile in timpul sarcinii (asimptomatice sau manifestându-se ca o stare gripala) pot evolua spre avort, nastere prematura sau septicemie in perioada *peripartum*. Nou-nascutul infectat in timpul nasterii poate face meningita dupa 1 – 4 saptamâni. Infectiile adultilor imunocompromisi: meningita, septicemie.

L. monocytogenes poate determina si gastroenterite, manifestate prin diaree apoasa, febra, cefalee, mialgii, crampe abdominale (+/- vomismente); de obicei sunt o consecinta a consumului de produse lactate contaminate, dar si produsele de carne (de ex. *hot-dog*) insuficient tratate termic pot fi implicate. Prevenirea infectiilor este dificila, deoarece organismul nu se imunizeaza, astfel ca este recomandata doar limitatea expunerii indivizilor imunocompromisi la sursele potentiale de infectie (animale infectate si produsele lor, vegetale contaminate). Listerioza nu este o boala transmisibila printre indivizii umani. Tratamentul prompt si prelungit cu antibiotice, cum ar fi tetraciclina, este eficient, dar recadereile sunt frecvente. Infectiile netratate pot avea

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

sfârsit letal. Tratamentul infectiilor invazive se face cu ampicilina +/- gentamicina. Tulpinile rezistente sunt rare. Gastroenteritele cu *Listeria* , de obicei, nu necesita tratament.

Diagnosticul de laborator. Se face de obicei microscopic, prin examinarea frotiurilor colorate Gram si prin cultivare. La microscop listeriile apar ca bacili Gram pozitivi, asemanatori cu difteroizii (fig. 20). Pe geloza-sânge dezvolta colonii mici, gri, cu o zona ingusta de β-hemoliza. Izolarea unei listerii este confirmata de mobilitatea bacteriilor, care le diferentiaza de corinebacteriile imobile. Identificarea se face pe baza testelor de fermentatie a zaharurilor. Este disponibil si sistemul microtest *API Listeria (BioMérieux)*.

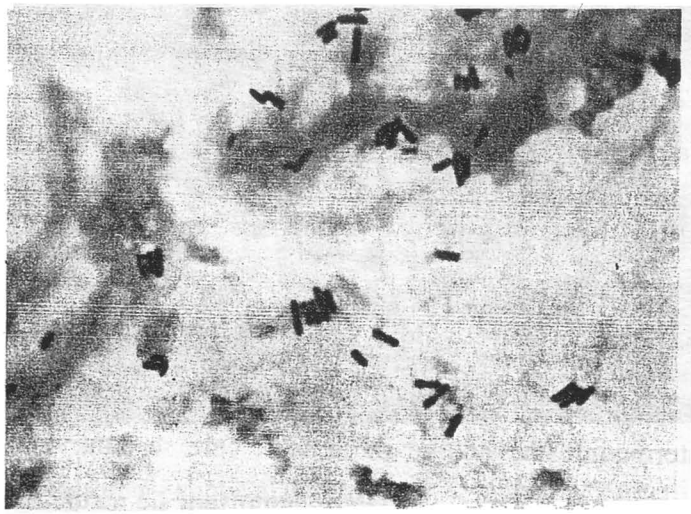


Fig. 20. *Listeria monocytogenes*. Imagine microscopica a unor bacterii Gram Pozitive, grupate in forma literelor L si V, ca si in palisade, asemnator Corinebacteriilor (marire: x 1000).

BACILI GRAM POZITIVI FILAMENTOSI

Incadrare taxonomica: *Cls. THALLOBACTERIA (Actinobacteria = Actinomycetes)*

Actinomycetes = ciuperci in forma de raze, intr-o traducere *ad literam*, aceasta fiind denumirea initiala a acestui grup, denumire datorata structurii de tip micelian a acestor microorganisme. In realitate, actinomicetele sunt eubacterii Gram pozitive, filamentoase, ramificate, cu structura de tip micelian, care se multiplica prin spori de propagare.

Confuzia cu ciupercile a provenit din faptul ca s-a folosit aceeasi terminologie, respectiv termenul de *tal* pentru ansamblul filamentelor ramificate si de *sporangi* si *spori* pentru organele de sporulatie.

Prima descriere a acestor microorganisme i se datoreaza lui F. Cohn, care a izolat in 1875 din canalul lacrimal, o tulpina apartinând speciei *Septothrix foersti*. In 1877, Harz a izolat din leziuni cutanate ale bovinelor specia *Actinomyces bovis*.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Miceliul este reprezentat de o masa de filamente subtiri, ramificate, intretesute ca o pâsla, fiind asemanator cu al ciupercilor inferioare (micromicete), intre care au fost incadrate initial, datorita unor insusiri morfo-fiziologice comune cu acestea dar care nu sunt esentiale pentru incadrarea taxonomica, cum ar fi: miceliu format din hife cu ramificatii adevarate; formarea de spori de propagare (diseminare), spre deosebire de endosporii celorlalte eubacterii, care reprezinta o forma diferentiere a celulei bacteriene vegetative, cu rol de rezistenta in conditii nefavorabile de mediu.

Asemanarea cu bacteriile este insa fundamentala si se refera la: organizarea celulara de tip procariot: material nuclear liber in citoplasma, nedelimitat de membrana nucleara (la *Streptomyces sp.* si *Mycobacterium avium, M. xenopi* – s-a descoperit existenta de cromozomi si plasmide lineare cu secvente proteice, numite *invertroni* la capatul 5' al moleculei de ADN, care este astfel protejata de actiunea endonucleazelor – Picardeau si colab., 1998); lipsa mitozelor in procesul multiplicarii; lipsa organitelor membranare; structura peretelui celular- tipica bacteriilor Gram pozitive; lipsa chitinei, substanta omniprezenta in peretele celular al fungilor; existenta unor specii cu metabolism respirator strict anaerob si a unor specii cu nutritie chimioautotrofa, caractere care nu sunt prezente niciodata la fungi; sensibilitatea la substante antibiotice antibacteriene si lizozim; sensibilitatea la bacteriofagi (=actinofagi).

Habitat. Actinomicetele reprezinta aprox. 30% din populatia microbiana a solului, dintre care unele pot contamina si infecta omul si animalele. Specii saprotrofe se pot dezvolta si pe diferite produse alimentare, pe care le altereaza si le imprima un miros particular, de pamânt, camfor sau fructe. Exista specii **comensale** pe piele si mucoase, la om si animale si specii **conditionat patogene**.

Morfologie. Sunt organisme filamentoase, ramificate, hifele având un diametru mic (0,5 – 1, max. 2 μm), comparativ cu al micromicetelor, fiind neseptate si multinucleate. Filamentele prezinta o mare varietate de tipuri morfologice. Astfel, cele care se dezvolta pe suprafata substratului formeaza miceliul vegetativ sau primar, pe suprafata acestuia aparând ramificatii cu o morfologie particulara numite sporofori sau conidiofori, pe care se formeaza sporii de propagare sau conidiile; aceste ramificatii constituie miceliul secundar. Desi sunt bacterii Gram pozitive, unele (Fam. *Mycobacteriaceae*) sunt foarte greu colorabile prin aceasta metoda si prezentând proprietatea de acidoalcoolorezistenta - particularitate datorata unei structuri deosebite a peretelui celular al acestor bacterii (vezi Cap. Bacterii acidoalcoolorezistente).

Caractere de cultura. Dupa insamântare, culturile de actinomicete se dezvolta lent, in 4 – 5 zile de incubare. Pe medii de cultura solide (mediul sintetic selectiv Gauze) actinomicetele

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

dezvolta colonii compacte si aderente la mediu, cu aspect uscat, cretos, in general nepigmentate, pentru ca desi sintetizeaza pigmenti, acestia sunt eliberati in mediu, fiind cromopare.

Caractere fiziologice. Toate speciile sunt aerobe, cu exceptia speciilor incadrate in Fam. *Actinomycetaceae* care pot fi aerobe, aerobe facultativ anaerobe si strict anaerobe. Folosirea numelui generic de *Actinomyces* a fost limitata de catre Wright la actinomicetele anaerobe, ceea ce a ramas valabil pâna azi. Speciile aerobe au fost incadrate in genurile *Mycobacterium, Nocardia, Micromonospora, Streptomyces.* Actinomicetele au o nutritie heterotrofa, fiind omnivore datorita unui echipament enzimatic complex. Temperatura de dezvoltare: majoritatea speciilor sunt mezofile. Se dezvolta optim la valori ale pH-ului cuprinse intre 7 – 8.

Reproducerea se face pe cale asexuata, prin spori de propagare, cu diferite denumiri preluate din micologie. Sporii sunt sferici, ovalari sau cilindrici si spre deosebire de endosporul bacterian tipic, sporii actinomicetelor se pot evidentia prin coloratia simpla cu fucsina bazica.

Clasificare. Initial criteriile de clasificare erau bazate pe criterii exclusiv morfologice (miceliu, spori, sporofori) care prezinta insa o mare variabilitate, reflectând conditiile de mediu variate in care se dezvolta. Criteriile oferite de biologia moleculara: determinarea continutului in baze azotate al acizilor nucleici, stabilirea gradului de omologie a moleculelor de ADN pe baza testelor de hibridizare, confera un grad mai mare de obiectivitate sistemelor de clasificare. Sunt recunoscute in prezent trei grupe de actinomicete semnificative pentru patologia umana:

Fam. *Mycobacteriaceae* – va fi prezentata in **Cap. Bacterii acidoalcoolorezistente**
G. *Mycobacterium*
Fam. *Actinomycetaceae*
G. *Nocardia*
G. *Actinomyces* – grupeaza exclusiv specii strict anaerobe;
G. *Micromonospora*
Fam. *Streptomycetaceae*
G. *Streptomyces*

Patogenie. Specii ale genurilor *Nocardia, Actinomyces* pot determina infectii viscerale, mai ales pulmonare - de ex., *Nocardia sp.,* prezenta in tartrul dentar, a fost izolata din lichidul pleural. Specii de *Nocardia sp. (N. asteroides, N. brasiliensis)* produc mai frecvent infectii ale membrelor inferioare (2/3 din cazuri), numite micetoame (mai ales in zonele tropicale) deoarece sunt asemanatoare cu infectiile micotice (un alt motiv de confuzie cu ciupercile), dar mai distructive si cu o evolutie mai rapida decât acestea. Alte localizari: pielea capului, ceafa, torace, umeri, brate, in general orice zona descoperita si contaminata cu sol (praf) a unor leziuni mecanice preexistente. La inceput apar unul sau mai multi noduli, care se maresc, conflueaza, se ulcereaza eliminând un lichid purulent sau serosanguinolent, apoi invadeaza muschii si oasele,

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

care sunt distruse. Bolnavul are dureri, prurit, senzatia de arsura si in cele din urma devine infirm (piciorul de Madura). Pot aparea si metastaze viscerale sau cerebrale fatale. Perioada de incubatie a bolii este de saptamâni sau ani de zile, evolutia este cronica si fara vindecare spontana. Prognosticul este bun, cu exceptia metastazelor viscerale. Tratamentul etiologic se face cu streptomicina, rifampicina.

*Nocardia minutissima (*reincadrat si denumit in prezent *Corynebacterium minutissimum)* determina afectiuni cutanate la nivelul pliurilor, asemanatoare eczemelor.

Speciile de *Actinomyces* sunt anaerobe si comensale ale cavitatilor naturale la om si animale (mamifere); niciodata izolate din sol, aceste specii pot fi conditionat-patogene, fiind agentii actinomicozei cervicofaciale la om si animale. Aceasta localizare cervicofaciala si cerebrala este predominanta (50% din cazuri), urmata de localizarea abdominala (apendice perforat, ulcer perforat), toracala (pleurezie) si alte localizari mai putin frecvente. Infectiile provocate sunt putin contagioase, in mod asemanator cu cele provocate de alte bacterii strict anaerobe. Dezvoltarea bacteriilor si infectia consecutiva este favorizata de:

- contuzii ale tesuturilor, cum sunt cele provocate de extractiile dentare si fracturi ale maxilarului;
- staza la nivelul canalelor excretoare, provocata de ex. de litiaza renala;
- prezenta altor germeni anaerobi (de ex. fuzobacterii si spirochete);
- corticoterapie, care determina un efect de imunosupresie.

Infectia se poate extinde in tesuturile si organele vecine prin contiguitate, ca si pe cale sanguina (nu si pe cale limfatica). O reactie de scleroza a tesuturilor invecinate limiteaza propagarea infectiei, dar favorizeaza supravietuirea germenilor datorita mediului anaerob creat si limitarii patrunderii antibioticelor. Procesul de necroza aparut in interiorul unei leziuni deja sclerozate, conduce la formarea unui abces si explica recidivele, necesitatea unor tratamente prelungite cu antibiotice si de multe ori a unei interventii chirurgicale.

Actinomyces israëlii (A. bovis) este o specie prezenta pe dintii cariati, ca si in criptele amigdaliene, constituind focare inflamatorii cronice. Poate determina leziuni subcutanate ale regiunii cervico-faciale si fistule ale acestora, prin care se elimina granule galbui sau albicioase (germeni inglobati intr-un depozit lipidic provenit din tesuturile gazdei). Alte localizari: repiratorie, digestiva, genitala, rinichi, ficat, oase, glande lacrimale, sistem nervos central. Tratamentul etiologic se face cu penicilina.

Speciile genurilor *Micromonospora, Dermatophilus* pot determina infectii cutanate care afecteaza parul, inclusiv la animalele producatoare de lâna.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Streptomyces madurae, S. somaliensis determina micetoame la om.

Tropheryma whippelii - determina maladia lui Whipple care este o infectie bacteriana sistemica , cu predominanta digestiva, dar si cu tulburari neurologice si cu evolutie cronica. Agentul patogen este o bacterie Gram pozitiva, bacilara, cu dimensiuni care variaza in limitele 1,5 – 2,5 μm / 0,2 μm, necultivabila pe culturi de celule si tesuturi, dar cu crestere intracelulara *in vivo* in macrofage, polimorfonucleare, fagolizozomi, enterocite, celule endoteliale, celule musculare netede, plasmocite, mastocite, limfocite intraepiteliale.

Este inrudita cu actinomicetele – caracter stabilit prin metode moleculare (tehnica PCR – amplificarea genelor pentru ARN 16 S de la bacteriile prezente in tesutul infectat, a permis identificarea acestei bacterii in 1992). Prima descriere a bolii a fost consemnata in 1907, de catre G Hoyt Whipple, la o pacienta cu poliarterita migratoare, tuse, diaree cronica, maladsorbtie, pierdere in greutate, adenopatie mezenterica, cu evolutie letala in timp de mai multi ani. In 1952 s-a consemnat primul caz vindecat cu streptomicina (tratament de lunga durata).

Poarta de intrare este digestiva, agentul patogen multiplicându-se in duoden si intestinul subtire. Se produce o infiltrare a stratului profund al mucoasei (*lamina propria*) cu macrofage PAS + (*periodic acid-Schiff*) si diseminarea bacteriilor in ganglionii limfatici mezenterici, in sânge si tesuturi (sistem nervos central, cord, membrane sinoviale, muschi netezi, ochi). Semnele caracteristice acestei boli sunt: sindrom de maladsobtie (cu diaree cronica cu steatoree, dureri abdominale, pierdere in greutate, stare subfebrila), sindrom articular polimorf (simple artralgii, artrite migratoare, reumatism) care pot preceda semnele digestive, atingeri seroase (pleurezii, pericardita), atingeri cardiovasculare (endocardita lenta, miocardita, arterite), atingeri ale sistemului nervos central (tulburari psihice si dementa, ataxie, pareze, oftalmoplegie, surditate) si alte semne (cutanate, hepatice, ganglionare).

Diagnosticul de laborator al infectiilor determinate de actinomicete

- prelevare de produs patologic din leziuni sau colectii;
- examenul direct pe preparate L/l a produsului patologic;
- izolarea in cultura pura a actinomicetelor:
  - **aerobe**
    - pe mediu Sabouraud (geloza glucozata), la pH neutru sau slab alcalin;
- frotiuri colorate prin metoda coloratiei simple cu fucsina bazica sau coloratia diferentiala Gram- examen microscopic – se evidentiaza bacterii filamentoase (fig.21), de multe ori insuficient, deoarece se distruge organizarea si morfologia

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

sporoforilor, astfel ca se apeleaza la efectuarea de culturi pe lame (lame imersate in mediu de cultura agarizat, topit si care se insamânteaza dupa solidificarea mediului in striuri paralele si se incubeaza la termostat intr-o camera umeda) si examinarea microscopica a acestora;

- **anaerobe**

- pe mediu pentru anaerobi (vezi Bacterii anaerobe), cu adaos de ser si sânge, acesta din urma pentru evidentierea capacitatii hemolitice a agentului patogen izolat; identificare biochimica, cu ajutorul sistemului API 20A (pentru anaerobi);

- specia tip: *Actinomyces israëlii* – la examenul microscopic se observa celule ramificate (asemanatoare difteromorfilor), cu aspect de „ramuri de copac" (fig. 22); pe mediu de cultura solid colonii in forma de dinte molar (fig. 23).

Fig. 21. Imagine microscopica a bacteriei *Nocardia asteroides* in produs patologic (sputa); bacili Gram pozitivi, ramificati (marire: x 1000).

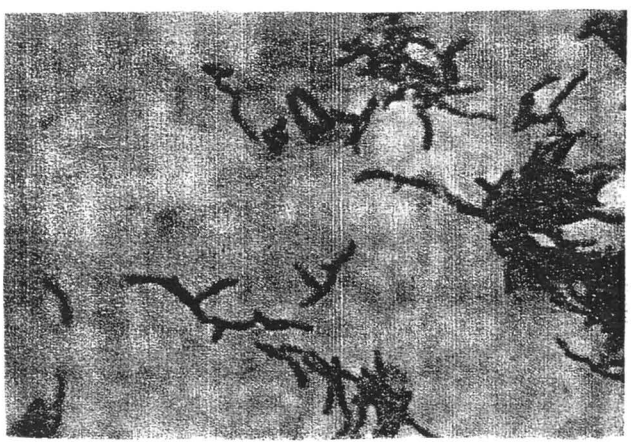


Fig. 22. Imagine microscopica pe preparat colorat Gram a unor bacterii din genul *Actinomyces sp.*, ramificate (~ ramuri de copac), scurte (marire: x 1000).

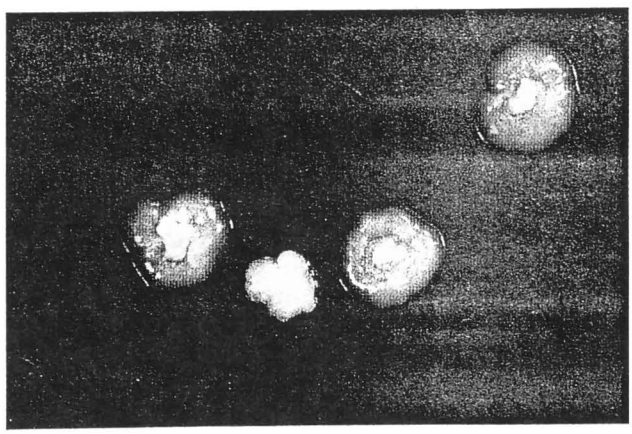


Fig. 23. *Actinomyces israelii* – colonii in forma de dinte molar.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

COCI GRAM NEGATIVI

G. *Neisseria sp.*

N. meningitidis – diplococ Gram negativ, oxidazo-pozitiv, incapsulat, numit in mod curent meningococ, care determina meningita. Se cunosc grupele serologice de meningococi A,B, C, Y si W-135. Meningococii patrund in organismul gazdei pe cale aerogena, prin picaturile Pflugge, eliminate de o persoana bolnava (rezervorul de infectie) prin tuse sau stranut, fiind germeni cu o slaba rezistenta in mediul extern, ceea ce explica aparitia cazurilor de meningita in colectivitati (scoli, cazarmi). In majoritatea cazurilor boala consta intr-o infectie a cailor respiratorii superioare, cu simptome asemanatoare gripei (*influenza-like*). Uneori, agentul patogen poate trece in circulatie (meningococemie), unde toxinele bacteriene pot invinge organismul in mai putin de doua ore, cauzând moartea. La supravietuitori, meningele este inflamat, ceea ce determina o crestere a presiunii asupra encefalului si maduvei spinarii. Pacientii au o stare caracteristica de rigiditate a corpului (intepeneala), gât arcuit si o cefalee intensa. Pe piele apare o roseata (*rash*), la inceput sub forma unor pete de un rosu deschis, care progreseaza spre spoturi vinetii – negre. Jumatate din cazurile netratate pot fi fatale. Diagnosticul precoce si tratamentul meningitei meningococice pot preveni leziuni ireversibile ale nervilor sau moartea pacientului. Tratamentul cu rifampicina, penicilina sau sulfamide este eficient in general. Un vaccin multivalent, continând polizaharide capsulare de la câteva serogrupe este produs din anul 1985, dar acesta este utilizat doar in circumstante speciale.

Diagnostic de laborator. Metoda principala de diagnostic este observarea microscopica a diplococilor Gram negativi in probele de lichid cefalorahidian, recoltate prin punctie spinala. *N. meningitidis* poate fi izolata si cultivata din acest lichid pe mediu Thayer – Martin (vezi Anexa IX). Este util si sistemul API NH. Este important diagnosticul diferential fata de meningitele determinate de alti agenti infectiosi (alte bacterii, cum ar fi *Haemophilus influenza b*, ca si microfungi, paraziti, virusuri).

Neisseria gonorrhoeae - diplococ Gram negativ, oxidazo-pozitiv, de mici dimendiuni, numit dupa Albert Neisser, cel care l-a descoperit in 1879. Ca si alte neisserii, gonococul are forma unor perechi de celule reniforme, imobile. Numit si gonococ, este agentul patogen al gonoreei, foarte sensibil in afara organismului gazda, ceea ce face ca foarte rar sa se produca infectarea de pe o suprafata uscata (de ex., de pe scaunul toaletei). Astfel ca in marea majoritate a cazurilor de gonoree, agentul cauzal se transmite de la persoana la persoana, prin contact sexual. Perioada de incubare variaza intre 2 si 6 zile. La femei, gonococii invadeaza suprafata epiteliala a cervixului si uretrei. Cervixul poate fi inflamat si o scurgere poate aparea

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

daca se exercita o presiune in regiunea pubiana. Pacientele reclama adesea durere abdominala si o senzatie de arsura la mictiune, iar ciclul menstrual normal poate fi intrerupt. Uneori, gonococii pot disemina spre trompele Fallope, care se intind de la uter la ovare. Cum aceste cai inguste sunt modificate in cursul infectiei, prezentând pliuri si bacterii aderate, trecerea ovulelor devine dificila. Se poate ajunge la blocarea completa sau salpingita; inflamarea tuturor organelor pelvice este cunoscuta sub numele de boala inflamatorie pelvica. Sterilitatea poate fi o consecinta a tesutului cicatriceal care ramâne dupa tratarea bolii sau femeia poate avea mai târziu experienta unei sarcini ectopice. Este important de semnalat faptul ca la femei aprox. 50 % din cazurile de infectii gonococice sunt asimptomatice, ceea ce favorizeaza transmiterea agentului patogen.

La barbati, gonoreea se manifesta mai intâi la nivelul uretrei. Infectia se insoteste de senzatia de furnicatura in penis, urmata in câteva zile de durere la mictiune, ca si de aparitia unei secretii la inceput apoase, apoi albicioase. Pe masura diseminarii agentului patogen, creste frecventa mictiunilor. Ganglionii limfatici inghinali se pot tumefia si testiculele pot fi dureroase. Infectia epididimului poate conduce la sterilitate. Simptomele infectiei gonococice la barbati tind sa fie mai acute decât la femei, astfel ca barbatii sunt diagnosticati si tratati mai repede.

Gonoreea nu apare numai la nivelul organelor genitale. Astfel, sunt semnalate cazuri de : faringita gonococica (agentul patogen transmis prin contact oral-genital) manifestata prin durere in gât si dificultati la inghitire; proctita gonococica, infectie a rectului (mai ales la homosexuali); conjunctivita sau keratita, infectii ale conjunctivei (transmitere prin atingerea conjuntivei cu mâna sau servetele contaminate).

Gonoreea este periculoasa mai ales la copii nascuti de catre mame infectate. Gonococii transmisi in timpul nasterii infecteaza ochiul nou-nascutului si genereaza oftalmia gonococica. Pentru a preveni aceasta infectie si orbirea consecutiva, in majoritatea statelor exista legi care impun tratarea ochilor nou-nascutilor cu câteva picaturi de solutie de nitrat de argint 1% sau solutie de antibiotice (eritromicina sau tetraciclina). Profilaxia acestei infectii se face doar prin masuri de igiena, deoarece nu exista vaccinuri disponibile. Producerea de vaccinuri anti- adezine, care utilizeaza ca antigene fimbrii purificate si care ar putea determina sinteza de anticorpi anti-fimbrii, cu efect de evitare a aderentei agentului patogen la suprafata celulelor sensibile, se afla in stadiu experimental si intâmpina dificultati datorita fenomenului de variatie antigenica.

Acest fenomen al variatiei antigenice reprezinta un mecanism prin care anumite specii de bacterii patogene sintetizeaza succesiv un numar mare de variante diferite ale moleculelor sau structurilor de suprafata, pentru a scapa de apararea imunitara a organismului gazda. Variatia

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

antigenica produsa *in vivo* ar fi determinata deci de presiunea imuna, care ar putea accelera evolutia sau selectia unor noi variante antigenice. Exemplul tipic de variatie antigenica la bacterii il constituie *Neisseria gonorrhoeae* – gonococul, comparat datorita acestei particularitati, de catre B. Brett Finlay si S. Falkow, cu un "cameleon iscusit" (mecanismul genetic de variatie antigenica a fimbriilor a fost prezentat in Cap. Factori de virulenta. Capacitatea de aderenta). Fenomenul explica incercarile nereusite de a obtine un vaccin anti-adezine pentru profilaxia infectiilor gonoreice, chiar si in cazul utilizarii unui vaccin polivalent.

Diagnostic de laborator.

Metoda « de aur » in diagnosticul gonoreei se bazeaza pe examinarea microscopica a frotiurilor efectuate din secretia tractului urogenital, colorate prin metoda Gram, ca si din culturi obtinute prin insamântarea produsului patologic pe mediu Thayer – Martin, pe culturi facându-se testul oxidazei. In identificare sunt utile si testele biochimice de fermentare a zaharurilor, sistemul API NH, metoda imunofluorescentei. Exista si teste rapide de diagnostic, bazate pe teste de aglutinare si pe metoda imunoenzimatica, care permit evidentierea indirecta a gonococilor in câteva ore si instituirea unui tratament in timpul cel mai scurt. Anticorpii anti-fimbrii isi gasesc aplicabilitate si in teste de diagnostic al infectiilor prin reactii imunoenzimatice, tip ELISA.

Diagnosticul se poate realiza si prin metode moleculare, de ex. prin teste de hibridizare a acizilor nucleici. Testul de diagnostic al infectiilor cu *Neisseria gonorrhoeae* prin metode moleculare (LCx *Neisseria gonorrhoeae* assay) se bazeaza pe reactia de amplificare LCR (*Ligase Chain Reaction*) pentru detectarea si cuantificarea moleculelor de ADN bacterian, direct in probele patologice reprezentate de probe de secretie endocervicala (de la femeie) sau uretrala (de la barbat), recoltate cu tamponul sau in probele de urina de la indivizi cu infectii simptomatice sau asimptomatice. Probele sunt tratate pentru ruperea peretilor celulari ai bacteriilor si separarea catenelor de ADN, prin incalzirea probelor in tamponul de transport al acestora.

Principiul metodei de amplificare LCR. Testul utilizeaza metoda LCR de amplificare a acizilor nucleici pentru a detecta prezenta gonococului direct in probele clinice. Testul utilizeaza 4 probe de oligonucleotide, complementare secventei tinta de pe *gena Opa* din genomul bacteriei *Neisseria gonorrhoeae*, pe care o recunosc si hibridizeaza cu aceasta, astfel ca secventele oligonucleotidice vor fi adiacente, moment in care pot fi legate (reunite) enzimatic, rezultând un produs de amplificare. Acesta, serveste ca tinta secundara pentru rundele ulterioare de amplificare, produsul acesteia fiind detectat cu ajutorul unui analizor *Abbot LCx*.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

BACILI GRAM NEGATIVI FACULTATIV ANAEROBI DREPTI

Fam. *Enterobacteriaceae*

Acest grup cuprinde bacili Gram negativi si constituie cele mai frecvente bacterii izolate din probele clinice. Sunt larg raspândite in natura, fiind prezente in sol si in ape, pe plante si, asa cum indica si numele familiei, in tractul intestinal al omului si animalelor; pot fi contaminanti ai alimentelor, atât de origine vegetala, cât si animala.

Bacteriile acestui grup au fost intens studiate datorita implicarii lor in patologia umana, largii raspândiri in natura, dar si datorita faptului ca au oferit un model ideal de studiu, prin cerintele lor nutritive reduse, ceea ce faciliteaza cultivarea si manipularea lor. Astfel:

- 1913 – Tworth – a descoperit liza fagica pe bacteria *E. coli*;
- 1918 – Bordet si Ciuca au descoperit fenomenul de lizogenie la bacterii tot *pe E. coli;* relatia virus-celula gazda a fost studiata pe modelul *E. coli* – bacteriofagul T4, rezultatele fiind extrapolate, cu prudenta, si la relatia celula animala – virusuri animale;
- 1925 – Gratia descopera bacteriocinele la *E. coli*, ceea ce explica denumirea initiala de colicine si de plasmide *col;*
- 1952 – Watanabe descrie la *Shigella sp.* fenomenul de rezistenta multipla la antibiotice;
- cercetarile de genetica bacteriana au avut ca modele de studiu tot enterobacterii: conjugarea bacteriana a fost studiata la *E.coli*, primele experimente de inginerie genetica s-au facut pe *E. coli K12*; in 1965 s-a acordat premiul Nobel pentru medicina geneticienilor Fr. Jacob si J. Monod pentru conceptul de operon si pentru modelul reglajului genetic pentru operonul *lac* ;
- studiul enterobacteriilor a permis si conturarea cadrului ecologiei intestinale, ca si a conceptului de « ecosistem intestinal » si descrierea relatiilor de simbioza, comensalism si competitie in cadrul acestuia si a modificarilor genetice produse *in vivo* – conjugarea, transformarea si dobândirea rezistentei multiple, demonstrându-se un potential foarte inalt de modificare a caracterelor biologice al bacteriilor intestinale; densitatea lor mare -10^9/g materii fecale si durata de generatie mica faciliteaza studiul acestor modificari; aceste particularitati biologice si genetice explica unele aspecte epidemiologice, tipizarea infraspecifica fagica fiind foarte necesara la enterobacterii.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Inainte de utilizarea antibioticelor, substantelor chemoterapeutice si imunosupresoare, infectiile determinate de enterobacterii erau relativ bine definite. Sindroamele diareice si dizenterice, insotite de febra si septicemie in cazurile clasice de febra tifoida si dizenterie erau cunoscute a fi determinate de *Salmonella sp.* si *Shigella sp.* Cazurile clasice de pneumonie, caracterizate prin producerea unei spute de un rosu-caramiziu ("currant-jelly") sunt cunoscute a fi determinate de bacilul lui Friedlander (*Klebsiella pneumoniae). Escherichia coli,* specii de *Proteus* si diferiti membri ai grupului *Klebsiella – Enterobacter,* sunt in mod obisnuit izolate din plagi traumatice contaminate cu sol sau materii vegetale sau din plagi operatorii abdominale, in chirurgia gastrointestinala.

Astfel, membrii acestei familii pot fi incriminati virtual in orice tip de boala infectioasa si intâlnita in orice tip de proba biologica analizata la laborator. Pacientii imunocompromisi sau debilitati sunt foarte sensibili la infectii dobândite in spital (infectii nosocomiale), fie dupa colonizarea cu tulpini din mediu, fie dupa proceduri invazive, cum ar fi cateterizarea, bronhoscopia, colposcopia, biopsii prelevate chirurgical, in care membranele mucoase sunt traumatizate sau sectionate.

Enterobacteriile formeaza un grup relativ omogen de bacili Gram negativi, unii mobili, altii imobili, care nu sporuleaza, care sunt aerobi, facultativ anaerobi, cu metabolism oxidativ sau fermentativ (transformând glucidele si alcolii superiori in acizi), cu proprietatea de a produce catalaza si de a reduce nitratii la nitriti; nu produc oxidaza (spre deosebire de speciile apartinând genului *Vibrio* si *Pseudomonas*); continutul de baze azotate guanina-citozina variaza intre 35 – 65 moli. Dimensiunile celulelor variaza intre 2 – 5 μm lungime si 0,2 – 0,4 μm grosime; majoritatea speciilor sunt mobile, fiind dotate cu flageli peritrichi, in timp ce putine specii sunt capsulate.

Taxonomie si nomenclatura. Familia *Enterobacteriaceae* include aproximativ 28 genuri (nu mai exista o alta grupa atât de mare), grupate in triburi, numarul speciilor fiind imposibil de cunoscut. Cele mai reprezentative genuri sunt urmatoarele:

Genul *Escherichia* cu cele 4 specii (specia *E. coli* fiind cea mai cunoscuta) formeaza grupul tip pentru definirea familiei.

Genul *Edwardsiella* – specia *E. tarda* – nu este semnalata decât in tarile calde, ca fiind patogena la reptile si pasari.

Genul *Salmonella* – pentru identificarea speciilor acestui gen, in 1934 Kauffmann a propus criteriul taxonomic, iar toate serotipurile determinate au primit nume de

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

specii, astfel ca acest gen include in prezent peste 2000 de specii, sau mai corect serotipuri, grupate in 3 grupe mari:

- *S. cholerae suis*, agentul patogen al holerei porcine, care poate fi transmis si omului determinând o boala septicemica;
- *S. typhi,* agentul febrei tifoide la om;
- *S. enteritidis* impreuna cu alte serotipuri reprezinta agenti patogeni ai toxiinfectiilor alimentare.

Genul *Shigella – Sh. dysenteriae*

- Sh. flexneri

Genul *Citrobacter – C. freundii*

*- C. diversus (*in prezent *C. koseri)*

Genul ***Klebsiella – K. pneumoniae***

- K. oxytoca

Genul *Enterobacter – E. cloacae*

- E. aerogenes

*- E. agglomerans (*in prezent *Pantoea agglomerans)*

Genul *Hafnia – H. alvei*

Genul *Serratia – S. marcescens*

- S. liquefaciens

Genul *Proteus – P. vulgaris*

- P. mirabilis

Genul *Morganella - M. morganii*

Genul *Providencia – P. stwartii*

- P. alcalifaciens

Genul *Yersinia – Y. enterocolitica*

- Y. pestis

- Y. pseudotuberculosis

Membrii acestei familii sunt implicati in etiologia unor procese infectioase la om, animale si plante. Dupa activitatea patogena la om enterobacteriile se clasifica astfel:

1. **Bacterii inalt patogene** (pestilentiale sau catastrofice);

   Yersinia pestis- specie considerata in prezent una dintre cele mai agresive bacterii, este agentul patogen zoonotic al ciumei, fiind transmis de rozatoarele salbatice; zona endemica - M-tii Stancosi – S.U.A.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Salmonella typhi –agentul patogen al febrei tifoide;

Shigella dysenteriae (tip 1) – agentul patogen al dizenteriei maligne (zona endemica – Asia de Sud-Est) ;

2. **Bacterii patogene** ;

   G. *Salmonella* (peste 2000 de serotipuri)

   G. *Shigella*

   Yersinia enterocolitica

3. **Bacterii conditionat-patogene;**

   G. *Citrobacter*

   G. *Enterobacter*

   G. *Klebsiella*

   G. *Edwardsiella*

   G. *Serratia*

   G. *Providencia*

   G. *Hafnia*

In aceasta clasificare, *Escherichia coli* ocupa o pozitie intermediara intre gupele 2 si 3. Anumite tulpini de *E. coli* sunt capabile sa produca infectii severe intestinale si extraintestinale. Tulpinile patogene de *E.coli* , care au dobândit seturi de gene de virulenta, sunt capabile sa produca diferiti factori de virulenta cum ar fi factori de aderenta (fimbrii, capsule), toxine, siderofori. In functie de mecanismele de patogenitate, epidemiologie, serotip si manifestari clinice, tulpinile de *E. coli* care determina boli diareice pot fi diferentiate in sase categorii majore desemnate ca:

- **Enteropatogene – EPEC** (**E**ntero**p**athogenic ***E. coli***) - serogrupele O cele mai comune (serogrupele O26, O55 etc.) poseda o plasmida de ~ 60 MDa, numita plasmida *EAF = **E**PEC **a**dherence **f**actor,* care determina capacitatea acestor tulpini de a produce un tip (*pattern)* de aderenta localizata la celulele liniei HEp-2 (fig. 24). Tulpinile EPEC determina diareea infantila severa la copilul sub vârsta de un an. Pe celulele epiteliale infectate formeaza colonii mici, proces denumit *aderenta localizata.* Aderenta initiala este urmata de atasarea intima a bacteriilor la suprafata celulelor gazda, mediata de proteina membranei externe numita *intimina* (94 kDa), care este considerata factor de virulenta al tulpinilor EPEC, fiind un produs al genei *eaeA* (exprimarea acestei gene este influentata de plasmida pMAR2 de 60-MDa care codifica formarea unor prelungiri membranare care leaga bacteriile aderate, numite in literatura de specialitate *bundle-forming pilus=BFP*). Dupa aderenta la suprafata celulelor

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

epiteliale, celulele EPEC produc leziuni de tip *attaching / effacing* (atasare-distrugere) = *A/E* (fig. 25), traduse in degenerarea microvililor celulelor cu marginea « in perie » si in organizarea filamentelor citoscheletului celulei epiteliale sub situsul de aderenta, rezultând structuri in forma de cupa (*cup-like)* sau piedestal (*pedestal-like*), care se pot alungi, formând proiectii de forma pseudopodelor. S-a dovedit ca formarea acestora este independenta de concentratia intracelulara a ionilor de calciu. In opinia unor autori, un factor major de virulenta al tulpinilor EPEC si ***Shiga toxin (STX)- producing E. coli*** (STEC, care sunt tulpini lizogene) in patogenia infectiilor intestinale la om si animale, este capacitatea de a cauza leziuni de tip *A /E* asupra microvililor enterocitelor. Rearanjarile filamentelor de actina si miozina sunt implicate si in internalizarea unor celule bacteriene de catre celulele gazda.

- **Enterotoxigenice – ETEC** (**E**nterotoxigenic ***E. coli***) - izolate frecvent de la copiii cu diaree, in tarile in curs de dezvoltare ; tulpinile ETEC sunt si agentii cauzali ai « diareei calatorilor ». Capacitatea de a adera si a coloniza epiteliul intestinal este asociata cu prezenta unor antigene fimbriale de suprafata numite factori de colonizare CFA I si II (*CFA = colonisation factor antigens*), prezente numai la tulpinile diareagenice. Dupa aderenta si colonizarea mucoasei intestinului subtire, tulpinile ETEC determina un sindrom diareic prin inhibarea resorbtiei Na^+ si a apei, datorita producerii si eliminarii unor exotoxine, cu tropism pentru celulele intestinale = enterotoxine : o toxina termostabila (ST) sau termolabila (LT), sau ambele tipuri, aceste toxine fiind asemanatoare cu cea a vibrionului holeric (bacterie Gram negativa care produce de asemenea o exotoxina).
- **Enteroinvazive – EIEC** (**E**nteroinvasive ***E. coli***) - penetreaza si se multiplica in celulele epiteliale ale colonului, producând modificari ale mucoasei intestinale si simptome asemanatoare cu cele prezente in sigeloza, infectie intestinala determinata de specii de *Shigella* , altele decât *Sh. dysenteriae.* Invazia celulelor intestinale de catre enterobacteriile conditionat-patogene (inclusiv EPEC, EIEC, EHEC, *Citrobacter freundii, Klebsiella pneumoniae*) se face cu participarea microtubulilor, rezultati prin polimerizarea tubulinei si, in general, nu este urmata de multiplicarea bacteriilor in celula gazda, astfel ca invazia in acest caz este doar o modalitate de a persista in organismul gazda. Spre deosebire de acestea, enterobacteriile patogene adaptate la parazitismul intracelular (*Salmonella sp., Shigella sp.*), la care invazia (mediata de proteine ale membranei externe numite *invazine*) constituie un mecanism principal de virulenta, se multiplica masiv intracelula si lizeaza celula-gazda.
- **Enterohemoragice – EHEC** (**E**nterohemorrhagic ***E. coli***) - apartin serogrupului O157 : H7, produc toxina *Shiga-like (SLT)* sau *verotoxina- (VT)* si determina producerea diareei, colitei

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

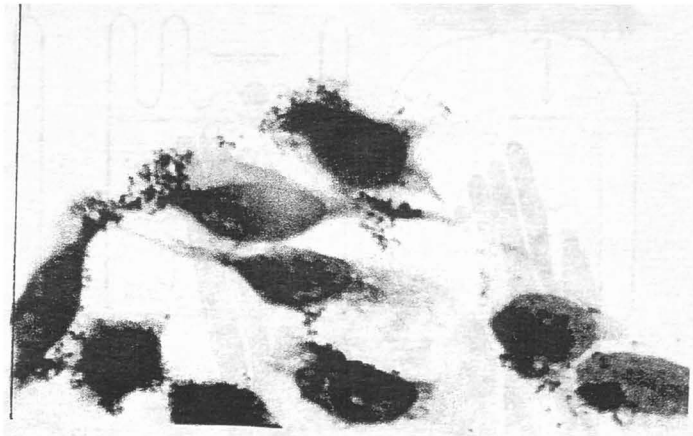
hemoragice si sindromului uremic hemolitic. S-a demonstrat ca si tulpinile EHEC, ca si alte enterobacterii cum ar fi *Citrobacter freundii* biotipul 4280, *Hafnia alvei* si mai recent *Enterobacter cloacae* (Lazar si colab.,2000) pot induce leziuni specifice la nivelul enterocitelor, de tip A/E (fig. 26). Aceste leziuni sunt determinate de o clasa de proteine ale membranei externe cu masa moleculara ~100 kDa, dintre care, mai bine caracterizata este *intimina*, codificata de gene cromozomale *eaeA*. Prin experimente de hibridare, s-a demonstrat ca aceste gene prezinta un grad mare de omologie cu genele *inv*, care codifica proteinele numite *invazine*, prezente in membrana externa a unor enterobacterii patogene : *Yersinia pseudotuberculosis* si *Y. enterocolitica, Salmonella sp., Shigella sp.*

- **Enteroaderente sau enteroagregative – EAggEC** (entero**aggr**egative ***E. coli***) - mai recent descris, acest patotip este distinct de alte patotipuri de *E. coli,* prin proprietatea celulelor unor astfel de tulpini de a adera la culturile celulare in monostrat, având un fenotip agregativ (fig. 2x), celulele bacteriene fiind suprapuse asemenea unor « caramizi ». Aceste tulpini produc diaree datorita unei toxine *ST-like* numita *EAST (enteroaggregative ST)* si o exotoxina de 120 kDa, similara cu hemolizina produsa de tulpinile uropatogene ;
- **Difuz aderente - DAEC (d**iffuse **a**dherent ***E. coli*** - tulpini de *E. coli* care **adera difuz** la suprafata celulelor eucariote in cultura – fig. 3x), care sunt de asemenea diareagenice la copilul mai mare de 18 luni.

Fiecare dintre aceste patotipuri afecteaza grupe diferite de populatie si au mecanisme diferite de patogenitate si virulenta. La om aceste grupe de tulpini de colibacili sunt asociate cu boala, incluzand diaree, boala dizenteriforma, colita hemoragica, sindromul uremic hemolitic, pneumonii, meningite si septicemii. Tulpinile patogene de *E.coli* poseda diferite adezine care se deosebesc prin capacitatea de hemaglutinare, morfologie, antigenitate si specificitate de receptor. Tipul 1 de fimbrii , capabile sa se ataseze la receptori care contin manoza (hemaglutinaea bacteriilor cu fimbrii manozo-sensibile este inhibata in prezenta D-manozei), determina aderenta celulelor de *E.coli* la mucus, la celulele tractului gastrointestinal, urinar, ale orofarinxului etc.), jucand un rol in colonizarea si diseminarea bacteriilor in corpul omului si animalelor. Mecanismele de patogenitate si virulenta ale acestor sase patotipuri ale tulpinilor diareagenice de *E. coli*, numite si *virotipuri* (termen derivat de la *virulenta*), sunt schematizate in fig. 27. Dintre numerosii agenti patogeni care provoaca infectii diareice (cauzele principale ale morbiditatii si mortalitatii in special in tarile subdezvoltate), reprezentantii familiei *Enterobacteriaceae* sunt predominanti, un loc aparte ocupându-l speciile conditionat-patogene,

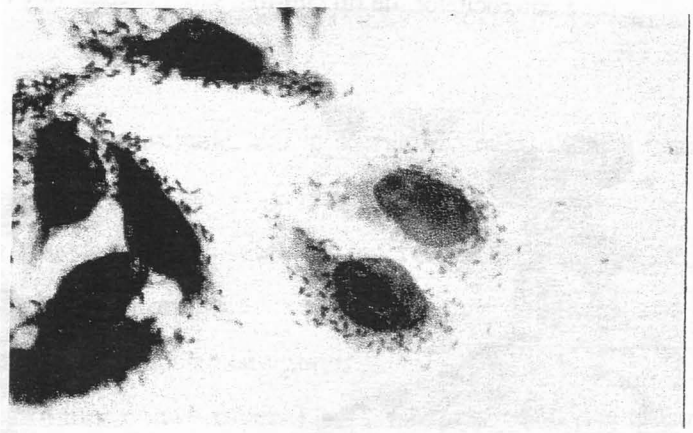
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Aderenta localizata



Aderenta agregativa

Aderenta difuza



Martor – celule HEp-2 neinfectate

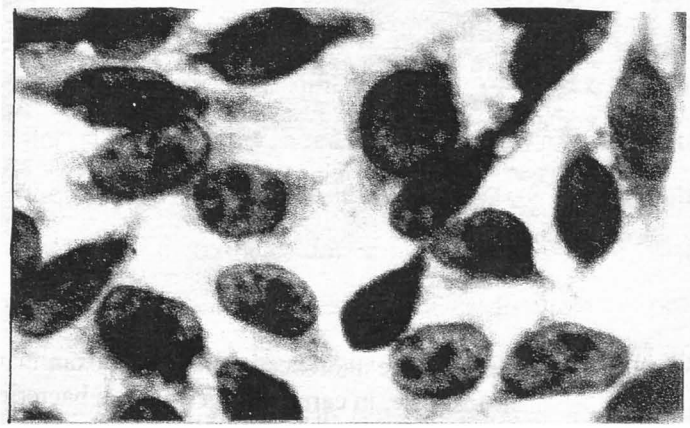


Fig. 24. Tipuri (*pattern*-uri) de aderenta caracteristice tulpinilor de *E. coli* care adera la linia celulara HEp-2 (*Human Epithelioma*) ; imagini la microscopul optic (marire : x 2500).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

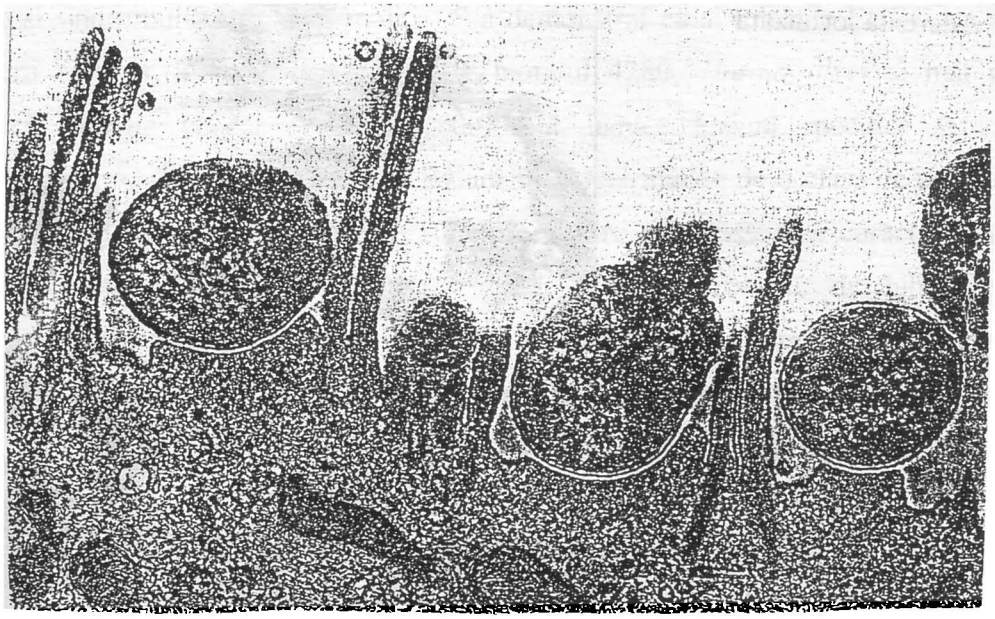
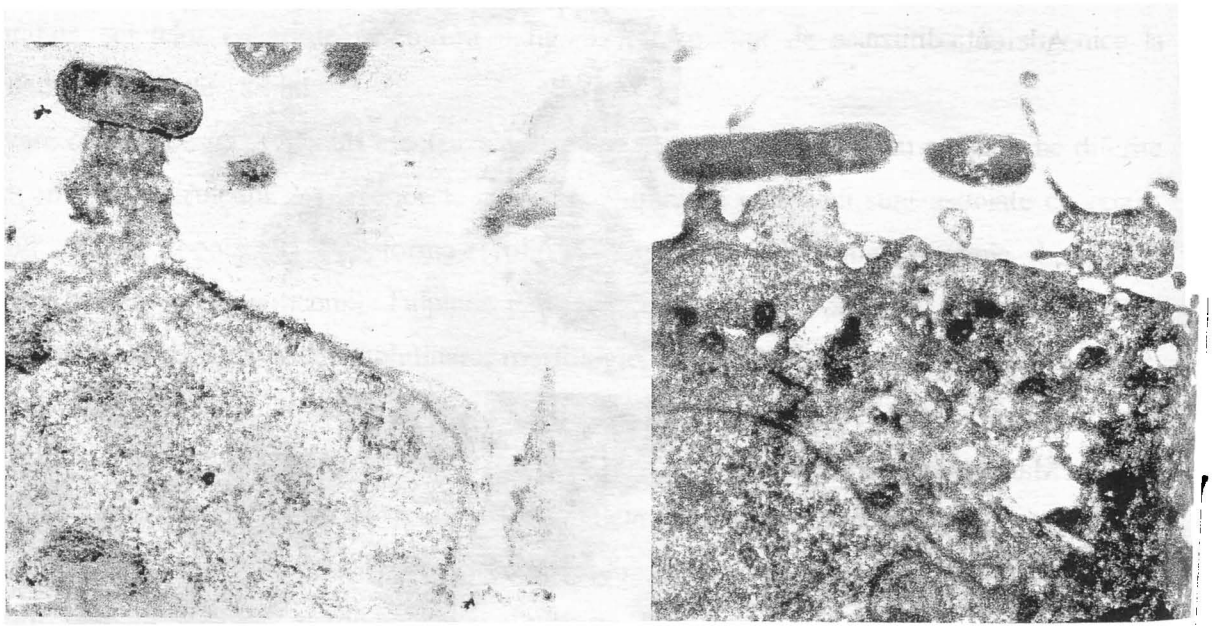


Fig. 25. Imagine electronomicroscopica a leziunilor caracteristice de tip A/E produse de celule bacteriene apartinând unei tulpini EPEC aderate la mucoasa intestinala; dupa atasarea intima a celulelor bacteriene la suprafata enterocitelor, se remarca disparitia microvililor, datorata retractiei lor si aparitia de protruziuni ale membranei plasmatice apicale a enterocitelor, de tip *cup-like* sau *pedestal-like* (Marire, x 45000).



a) b)

Fig. 26 a,b. Imagini ale unor sectiuni ultrafine examinate la microscopul electronic de transmisie, in care se observa celule bacteriene (*Enterobacter cloacae 43)* aderate la substratul celular (celule HEp-2 in cultura) si aparitia de expansiuni ale membranei plasmatice, de tip piedestal - *like* , numite si leziuni de tip A/E (*attaching/effacing*) (Marire: a) – 10.230x ; b) – 9.150x).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

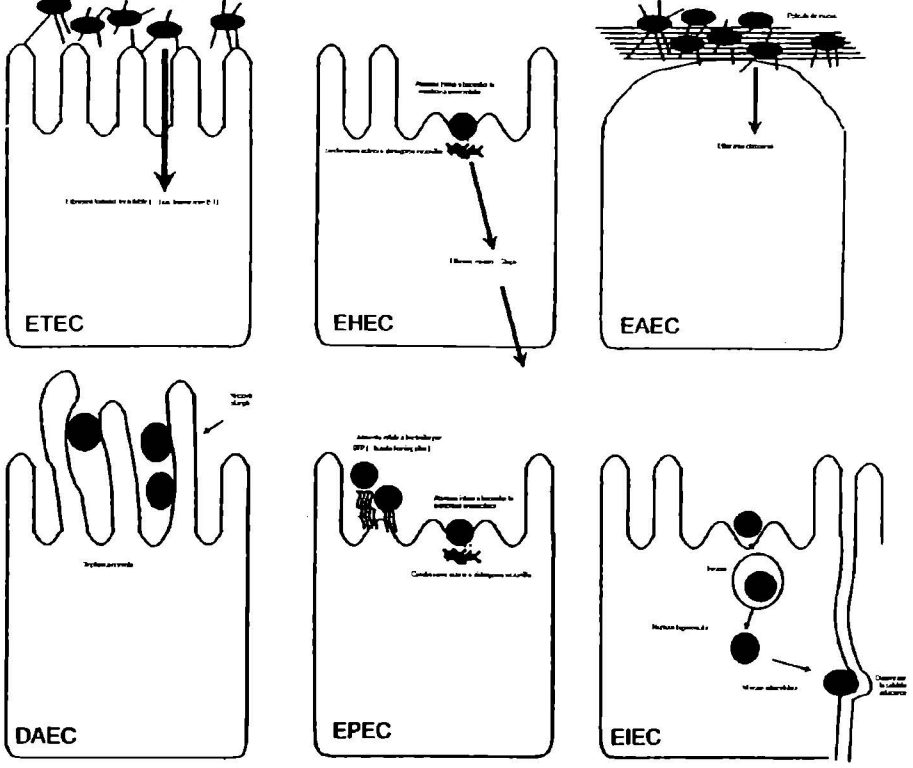


Fig. 27. Reprezentarea schematica celor sase patotipuri (virotipuri) de baza ale tulpinilor de *E.coli* care manifesta potential diareagenic ; LT- toxina termolabila (*cholera-like*) ; ST- Toxina termostabila ; SLT – toxina *Shiga-like.*

care pot determina o mare varietate de boli intestinale, dar si extraintestinale, aceasta capacitate datorându-se exprimarii a diferite seturi de gene de virulenta, dobândite de la specii si tulpini virulente, prin diferite mecanisme de transfer genetic, care se pot realiza fara bariere de gen si specie, mai ales in habitatul intestinal, caracterizat printr-o mare densitate populationala. Exista si tulpini nepatogene care nu poseda sau nu exprima aceste gene.

Patogenii Gram negativi (majoritatea enterobacterii) sunt cauza a 69% din cazurile de boli bacteriene diareice cauzate de ingerarea de alimente contaminate, raportate in S.U.A. (Mendonca, 1994). Preocuparile in lume la acest moment sunt legate de reducerea contaminarii initiale prin masuri corespunzatoare, dar si pentru prevenirea formarii de biofilme bacteriene, deoarece s-a demonstrat ca principalii factori de virulenta ai tulpinilor patogene de enterobacterii conditionat-patogene, sunt factorii de aderenta si toxinele, dar si sinteza de capsule, siderofori s.a.. Boala diareica este o problema de mari proportii; se estimeaza ca in lume se produc 1 miliard de episoade diareice, dintre care 3,3 milioane de cazuri sunt fatale, ceea ce plaseaza bolile diareice pe locul doi in privinta cauzei mortalitatii prin boli infectioase. Cele mai multe cazuri mortale se inregistreaza la copilul mic si in tarile in curs de dezvoltare (raport O.M.S., citat de Janda si colab., 1998). In ciuda acestor cifre alarmante, agentii etiologici ai

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

gastroenteritelor infectioase ramân adesea nedetectati; investigatii epidemiologice recente raporteaza o rata de detectare a bacteriilor enteropatogene in materiile fecale variind intre 29,1% si 52,8 %. Printre agentii enteropatogeni descrisi in ultimii ani figureaza agenti "reputati" , cum ar fi de exemplu *E. coli* enteropatogena, dar si unii mai noi: *E. coli* enteroaderenta, ca si unele bacterii considerate anterior ca simpli comensali ai tractului intestinal, printre care si o specie apartinând aceluiasi grup al enterobacteriilor – *Providencia alcalifaciens.*

Tulpinile de enterobacterii lactozo-fermentative , apartinând unor specii care sunt membri ai microbiotei intestinale autohtone si deci nepatogene in mod normal, dobândind determinanti genetici care codifica factori de virulenta, cum ar fi toxine, structuri de suprafata din categoria adezinelor, siderofori, isi pot manifesta potentialul patogen generând infectii oportuniste.

Enterobacteriile reprezinta familia cea mai mare de bacterii implicate in patologia umana (urmate de anaerobi, streptococi, stafilococi), si anume in :

I. –patologia enterala (digestiva) - aproximativ 1/3 dintre enterobacterii, in special *E. coli* si specii ale genurilor *Shigella, Salmonella* si *Yersinia*;

II. – patologia urinara - 78 - 92 % dintre infectiile urinare sunt cauzate de enterobacterii si in special de tulpini de *E. coli*, urmate de cele apartinand genurilor *Proteus, Klebsiella, Enterobacter* si *Serratia.*

III. – patologia respiratorie, agentii cauzali apartinand genurilor *Klebsiella, Serratia, Enterobacter* si speciei *E. coli.*

IV. – patologia generalizata (septicemica) – specia *E. coli* este frecvent implicata, dar si specii ale genurilor *Enterobacter, Serratia, Klebsiella.*

V. – patologia meningeala – se caracterizeaza prin forme severe de meningite, in special la copii la care bariera hematoencefalica este deficitara, cauzate de specii ale genului *Salmonella*, dar si *Serratia, Klebsiella*;

VI. – patologia localizata a partilor moi, a muschilor sheletici si a cavitatilor mari, in care sunt incriminate toate enterobacteriile, dar mai ales *E. coli, Proteus, Serratia, Citrobacter* care pot fi agenti de suprainfectie ai plagilor traumatice sau chirurgicale.

Din aceasta enumerare rezulta ca in afara de patologia intestinala care este dominata de specii de enterobacterii inalt patogene si patogene, enterobacteriile determina si infectii extraintestinale care sunt determinate de enterobacterii conditionat –patogene, care isi manifesta potentialul patogen la gazde cu imunodeficit fiziologic (varste extreme) sau patologic (de ex. la bolnavii cancerosi). La aceste gazde cu mecanisme de aparare deficitare enterobacteriile pot trece mai usor din intestin in circulatie, dar se poate manifesta si o patologie de spital,

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

determinata de tulpini bacteriene selectate in mediul spitalicesc, plurirezistente la antibiotice, care cauzeaza infectii localizate (urinare, respiratorii), dar cu mare tendinta la diseminare. Enterobacteriile ocupa primul loc intre agentii cauzali ai infectiilor nosocomiale. Manevrele chirurgicale, endoscopice (invazive) pot antrena un numar imens de enterobacterii (care altfel nu pot depasi barierele naturale) dinafara sau din cavitati (infectii de origine endogena), in organism (inclusiv in cavitati indemne), fiind cauza unor infectii iatrogene. Numeroase sunt si infectiile asociate utilizarii dispozitivelor medicale protetice confectionate din biopolimeri, la care adera mai ales enterobacterii conditionat-patogene, aceste infectii fiind dificil de combatut datorita uneia din cele mai importante proprietati ale microorganismelor aderate - *rezistenta fenotipica* la substante antimicrobiene.

*

Diagnosticul de laborator al enterobacteriozelor urmeaza reguli prestabilite, in sensul ca pe langa diagnosticul bacteriologic care urmareste izolarea agentului infectios, este necesar si diagnosticul serologic, practicat in mod constant in febrele tifoide si paratifoide (agenti cauzali: *Salmonella typhi* si *Salmonella paratyphi*), dar si in cazul tulpinilor patogene de *E. coli.*

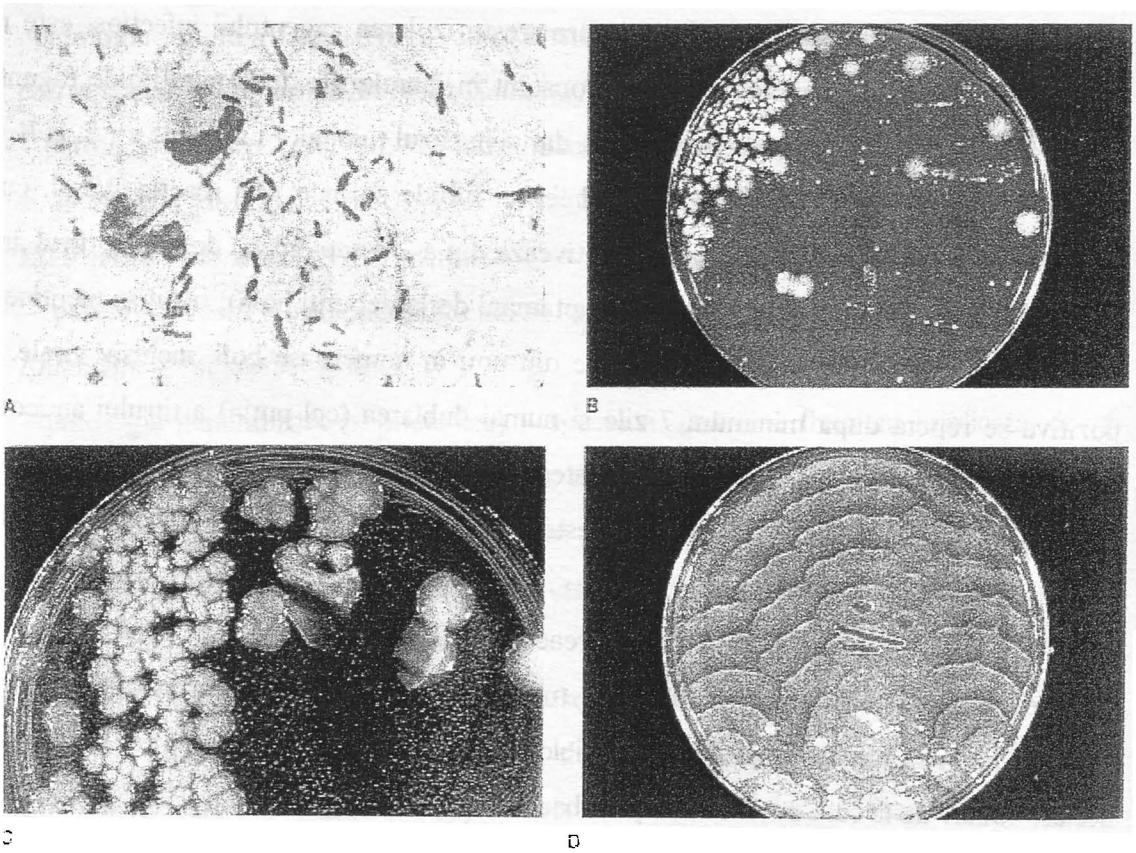
De exemplu, diagnosticul serologic al febrei tifoide se face prin reactia Widal, cu antigene somatice O si flagelare H. Reactia se pozitiveaza din a 2-a saptamâna de boala, titrul anticorpilor fiind maxim in convalescenta (dupa 4-5 saptamâni de la debutul bolii); titrul se mentine ridicat 5-6 luni, apoi scade, dar poate poate creste din nou in numeroase boli, inclusiv virale. O reactie pozitiva se repeta dupa minimum 7 zile si numai dublarea (cel putin) a titrului anticorpilor este considerata semnificativa, pe când o crestere moderata este nespecifica. Reactia serologica de evidentiere a antigenelor de invelis "Vi" este utila demonstrarii starii de purtator de salmonele in vezicula biliara.

In anumite cazuri, se practica si o reactie serologica de control, de confirmare a etiologiei infectiei, printr-o reactie de aglutinare in tub, intre celulele bacteriene apartinând tulpinii de *E. coli* sau *Proteus,* de ex. izolate dintr-o pielonefrita (infectie urinara inalta) si serul recoltat de la acelasi bolnav de la care s-a izolat tulpina bacteriana.

Diagnosticul bacteriologic urmeaza etapele clasice: **izolarea in cultura pura** si **identificarea agentului patogen**. Trebuie sa se ia in consideratie doua aspecte : 1) implicarea foarte larga a enterobacteriilor in patologie, astfel ca pot fi prezente in numeroase produse patologice, cum ar fi materii fecale, urina, sânge, aspirat bronsic, lichid de ascita, colectii purulente, produse necroptice, ape, alimente etc. si 2) implicarea in patologie a speciilor conditionat-patogene, astfel ca in cazul acestor germeni, simpla lor evidentiere nu constituie o

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Fig. 28. Identificarea prezumtiva a enterobacteriilor, pe baza caracterelor de cultura si .morfologice:
A- Imagine microscopica a unui frotiu efectuat din sputa: bacili Gram negativi si leucocite PMNN;
B- Colonii mari ale unor enterobacterii mobile si colonii punctiforme ale unor bacterii imobile, pe geloza sânge;
C-Colonii mucoide pe mediu McConkey - *Klebsiella sp.*
D- Crestere "in valuri" (invazie) pe geloza *chocolat* . -*Proteus sp.*



https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

dovada ca acestia reprezinta agentul cauzal al infectiei investigate, pentru aceasta fiind necesare dovezi suplimentare.

Produsele patologice si examenele de laborator prin care acestea sunt investigate au fost impartite in trei categorii:

I. Prelevate fara microbiota asociata, recoltate din cavitati natural sterile: sânge, LCR, exudat pleural, peritoneal, toate colectiile nedeschise (articulare, abcese – se punctioneaza);

II. Prelevate potential contaminate cu microflora de asociatie: bila, urina ;

III. Prelevate natural contaminate: materii fecale, voma, resturi alimentare, probe necroptice, alimente, ape etc.

I. *Prelevate fara microbiota asociata, recoltate din cavitati natural sterile* : modul de prelucrare a acestor probe este relativ simplu, in sensul ca toate enterobacteriile cresc pe medii uzuale, cum ar fi geloza simpla, care permite izolarea enterobacteriilor, geloza-sânge (mai indicata in cazul asocierii cu coci Gram pozitivi si bacili Gram negativi mai pretentiosi, care nu cresc pe geloza) sau medii slab inhibitorii, cum ar fi geloza Mac Conkie sau geloza tip Levine (EMB-eozine, methylene blue = GEAM). De ex. speciile genului *Proteus* sunt foarte mobile si invadeaza placa, astfel ca nu se pot obtine colonii izolate; daca este prezent si un al doilea germen, acesta nu mai poate fi izolat. Mediile de imbogatire (lichide) sunt recomandate in cazul unor produse sarace in bacterii, ca urmare a inceperii unui tratament cu antibiotice. Se insamânteaza 1-2 ml de produs in bulion nutritiv, se incubeaza 24 h si din aceasta cultura se face insamântarea pe mediu solid pentru izolare.

Hemocultura se face respectand anumite reguli: recoltarea se face in maximum 24 h de la internarea pacientului, executându-se 3 punctii diferite, la intervale de 2 h de regula si minimum 30 min. Se recolteaza câte 10 ml de sânge, cu exceptia copilului de la care se recolteaza 2ml. Sângele se insamânteaza pe bulion simplu cu adaos de SPS (sodiu polyanethol sulfonat 0,025%), cu rol inhibitor al procesului de fagocitoza, ca si al antibioticelor aminoglicozidice (gentamicina, tobramicina); incubarea se face la 37°C, timp de 7 zile; dupa a 2-a zi de incubare se face obligatoriu examenul microscopic, chiar daca mediul este limpede, executând preparate dupa centrifugarea culturilor si care se coloreaza Gram. Se fac insamântari si pe geloza simpla, care se incubeaza aerob si anaerob.

II. *Prelevate potential contaminate*: urina, bila .

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Se practica *urocultura calitativa si cantitativa* (este unul din putinele cazuri de analize bacteriologice cantitative), scop in care se fac insamântari pe geloza simpla, geloza sânge si pe mediu selectiv Mc Conkie sau AABTL (agar albastru de brom timol lactoza). Urocultura este considerata semnificativa la densitati de peste 10^5 bacterii/ml urina. In cazul uroculturilor pozitive, se repica doua colonii dintre cele dominante, care se identifica biochimic.

III. *Prelevate natural contaminate* – dupa prelevare urmeaza o etapa de prelucrare, de aducere a acestuia in forma lichida sau semilichida, potrivita pentru inoculare. Materiile fecale, recoltate in coprorecoltoare se omogenizeaza in mediul de recoltare si transport (Cary-Blair sau Stuart) si apoi se fac insamântari cu scopul realizarii examenului microbiologic specific acestui produs biologic, numit *coprocultura.* Produsele solide sunt triturate in mojare sterile, in proportie de 1/10 in apa fiziologica sterila. Din suspensia rezultata se fac insamantari. Pentru carne se admite folosirea unor mixere speciale, cu cupa si cutit detasabile, care se pot steriliza. Produsele semisolide (ou, creme) se emulsioneaza 1/10 in apa fiziologica sterila.. Probele lichide, cum ar fi supuratiile plagilor deschise abcedate spontan, ale plagilor chirurgicale infectate, se insamanteaza ca atare.

Dintre bacteriile patogene, *Salmonella sp.* necesita folosirea unor medii de imbogatire, cum ar fi cel cu selenit acid de sodiu (10 ml + 7-10 picaturi de suspensie de materii fecale), mediu Muller-Kauffmann pentru *S. typhi*, bulion BGN (bulion pentru Gram negativi). Imbogatirea este necesara deoarece salmonelele provin in numar mare din alimente, se multiplica in partea anterioara a intestinului proximal si se elimina in numar mare, dar se dilueaza in scaunul diareic (2 - 3 l) din care se recolteaza o cantitate mica, astfel ca este necesara imbogatirea. Aceasta etapa intermediara nu este necesara pentru *Shigella* si *E. coli* care se dezvolta in intestinul terminal, rectosigmoid si se elimina in numar mare in scaun.

Izolarea agentului patogen se face pe medii selective, solide, care contin inhibitori pentru alte grupe de bacterii decât cele de interes (mai ales pentru bacterii gram pozitive si fungi). Exista trei grupe de medii selective: 1) slab selective, 2) moderat selective si 3) inalt selective.

1) – *medii slab selective* sunt medii cu putere inhibitorie slaba care permit dezvoltarea tuturor enterobacteriilor; inhiba *Proteus sp., Alcaligenes sp.* (creste *Acinetobacter sp.):* mediul Mc Conkie, mediul Levine (incubare 24 h);

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- pe mediul Mc Conkie se diferentiaza coloniile bacteriilor lactozo-fermentative care sunt rosii (si mediul in jurul lor devine rosu si opalescent), rotunde, bombate, umede, pe mediul slab roz. Coloniile bacteriilor lactozo-nefermentative sunt albicioase, mai putin intinse si nu modifica mediul (fig.29, A, B);
- pe mediul Levine (utilizat in special pentru analiza bacteriologica a apei) bacteriile lactozo-fermentative formeaza colonii colorate in rosu inchis; *Klebsiella* formeaza colonii mai intinse si, ca si cele de *E. coli,* pot avea uneori luciu metalic (fig.29 C,D); coloniile lactozo-nefermentativilor sunt mai mici si nepigmentate.

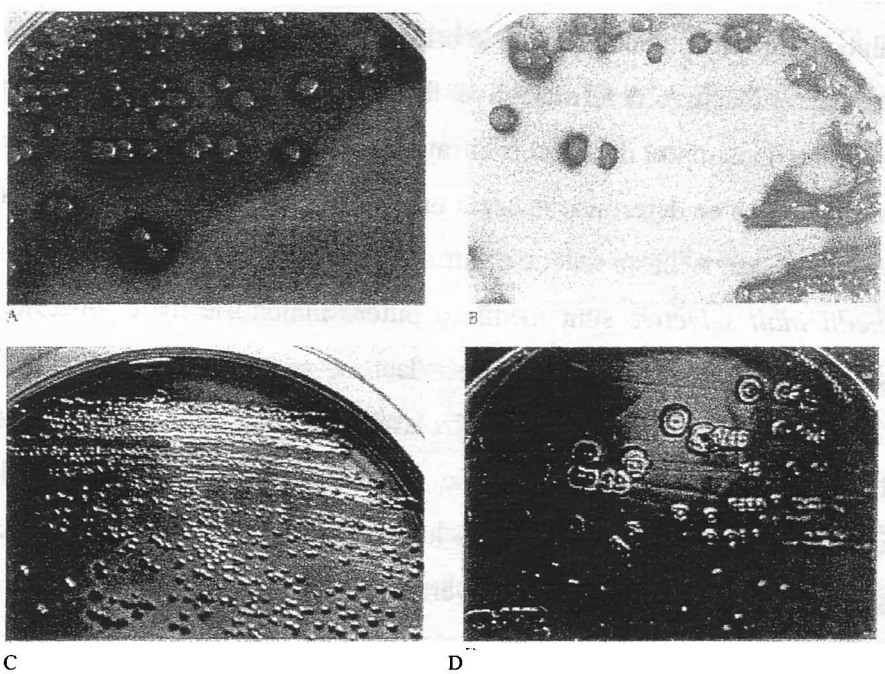


Fig. 29, A,B,C,D. Izolarea enterobacteriilor si diferentierea celor lactozo-fermentative pe medii slab selective: pe mediul Mc Conkie – A- enterobacteriile lactozo-fermentative formeaza colonii rosii, care modifica mediul in jurul lor si B - enterobacteriile lactozo-nefermentative formeaza colonii nepigmentate, care nu modifica mediul; pe mediul Levine (EMB) – C – enterobacteriile lactozo-fermentative formeaza colonii colorate in rosu inchis si D - coloniile lactozo-nefermentativilor sunt mai mici si nepigmentate; *Klebsiella* formeaza colonii mai intinse (D) si, ca si cele de *E. coli (C),* pot avea uneori luciu metalic.

2) – *medii moderat selective* sunt medii cu putere inhibitorie medie, care permit dezvoltarea speciilor lactozo-nefermentative (*Salmonella sp., Shigella sp., Yersinia sp., Proteus sp.*) si inhiba partial enterobacteriile lactozo-fermentative si alti bacili Gram negativi: mediul A.D.C.L. (agar deoxicolat lactoza) si mediul S.S. *(Salmonella - Shigella.*) au compozitie asemanatoare si un timp de incubare de 24 - 48 h.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- mediul A.D.C.L. neinsamântat este roz, pe care lactozo-nefermentativii dezvolta colonii semitransparente, rotunde, luciose, care la 48 de ore devin negre in centru, evidentiind bacteriile producatoare de H_2S (*Salmonella sp., Proteus sp.*); niciuna din speciile lactozo-fermentative nu produce centru negru . Aceste sopecii se dezvolta sarac (mai ales *Klebsiella sp., Enterobacter sp.*). *Serratia sp.* se dezvolta si formeaza colonii rosii, bombate, dar nu se izoleaza niciodata din scaun (exceptie - nou-nascut).
- diferentierea genurilor pe mediul SS *(Salmonella - Shigella.)* se bazeaza pe fermentarea si absorbtia consecutiva a indicatorului rosu neutru de catre coloniile bacteriene. Bacteriile Gram pozitive si bacteriile coliforme sunt in mod obisnuit inhibate de sarurile biliare, verdele brilliant si citrati. *Salmonella sp., Shigella sp.* si alte bacterii lactozo nefermentative formeaza colonii translucide sau transparente, incolore. Tiosulfatul de sodiu si citratul feric, detecteaza producerea de hidrogen sulfurat, ceea ce determina in cazul unei reactii pozitive aparitia unor colonii cu centrul negru. Aceasta reactie o pot da si unele tulpini de *Proteus.*

3) *medii inalt selective* sunt medii cu putere inhibitorie mare, utilizate pentru izolarea salmonelelor (inhiba alte bacterii lactozo-negative - *Shigella, Yersinia*); mediu Wilson-Blair recomandat pentru izolarea speciei *S. typhi ;* pe acest mediu cu aspect laptos (neinsamântat) - coloniile de *Salmonella* sunt negre, plate, rugoase si inconjurate de un halou negru, cu luciu metalic ; alte enterobacterii, cum ar fi speciile genului *Proteus* dezvolta colonii verzui-maronii, fara halou;

- mediu agar verde briliant (AVB)- mediu utilizat pentru izolarea salmonelelor din alimente si interzis in patologia umana pentru ca inhiba *S. typhi*; pe acest mediu se dezvolta colonii de un rosu-visiniu, pe fondul alb care vireaza in rosu-violet in jurul coloniilor. Se dezvolta si piocianicul (*Pseudomonas aeruginosa*) ;
- mediul Istrati – Meitert (cu bila bovina deshidratata) ;

Mediile inalt selective se examineaza obligatoriu dupa 48 h de incubare.

Mediul Drigalski (AABTL) este un mediu diferential folosit si in prezent pentru diferentierea speciilor lactozo-fermentative, de cele lactozo-nefermentative. Nu are inhibitori, nu este selectiv, permite cresterea si altor bacili Gram negativi, a cocilor si fungilor. Mediul neinsamântat este verde; coloniile speciilor lactozo-fermentative sunt galbene ca si mediul din jurul lor, iar cele ale speciilor lactozo-nefermentative nu vireaza sau vireaza la albastru intens.

La copil este obligatorie repicarea coloniilor lactozo-nefermentative. Regula generala: se repica cât mai multe colonii : 3-5 colonii, respectiv la adult si la copil (restrictie economica).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Daca nu exista colonii lactozo-negative, in cazul in care proba analizata provine de la un copil se repica minimum 10 colonii lactozo-fermentative; explicatia consta in faptul ca in patologia copilului mic intervin adesea bacteriile conditionat-patogene, mai ales *E. coli,* care de regula este nepatogena si se repica 10 colonii pentru a creste sansa izolarii tulpinii patogene. La adult coloniile lactozo-pozitive se repica când exista tulburari de tranzit (mai ales la persoanele politratate cu antibiotice).

Microbiota lactozo-fermentativa depaseste 85-90% ; când exista o proportie mare de *Klebsiella, Aerobacter, Haffnia,* aceasta poate indica o disbioza, mai ales la copiii polispitalizati. Scaderea numarului de *E.coli* sub 70% indica o disbacterioza, care nu se trateaza cu antibiotice, ci se recomanda administrarea de produse probiotice (de ex. preparate care contin tulpini selectionate de *Lactobacillus sp.*) care printr-un fenomen de antagonism, inhiba bacteriile lactozo-fermentative din alte specii decât *E.coli.*

*

Salmoneloza. Se numara de obicei printre cele mai frecvent raportate boli transmise pe cale digestiva, determinate de sute de serotipuri de *Salmonella.* Pentru acest gen se foloseste notiunea de serotip, in locul celei de specie datorita unor relatii incerte existente intre aceste organisme. Totusi cele mai frecvente specii implicate in etiologia salmonelozelor sau ai toxinfectiilor alimentare sunt: *S. typhimurium, S. heildelberg, S. enteritidis, S. newport.* Sunt bacili Gram negativi, cu flageli peritrihi, care patrund de obicei in intestinul uman odata cu alimentele. Dupa o perioada de incubare de 3 zile, individul infectat incepe sa manifeste febra, greata, vomismente, diaree si crampe abdominale. Ulceratiile intestinului sunt mai putin grave, comparativ cu cele din febra tifoida, iar patrunderea in circulatie este neobisnuita. Simptomele pot persista o saptamâna sau mai mult si in general aceasta boala este lasata sa evolueze fara administrare de antibiotice, care pot afecta tesuturile. Deshidratarea poate afecta anumiti pacienti si in aceste cazuri este importanta echilibrarea lor hidroelectrolitica.

Diagnosticul de laborator consta de obicei in izolarea tulpinii bacteriene din proba de scaun sau din proba recoltata cu tampon rectal, pe medii selective. Adesea infectia este numita gastroenterita sau simplu enterita.

Prin mijloacele moderne de detectie, agentii patogeni ai salmonelozelor au fost evidentiati si intr-o mare varietate de alimente: lapte pasteurizat, paste fainoase congelate, dar mai ales in carnea si produsele de carne de pasare, pentru ca diferitele serotipuri de *Salmonella* infecteaza in special gainile si curcanii. O alta cauza frecventa a salmonelozelor o reprezinta ouale contaminate, care intra in compozitia cremelor, placintelor, inghetatelor, maionezei. Inainte se

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

considera ca salmoneloza se datoreaza contaminarii cojii oualor si ulterior a continutului. Cercetatorii considera insa ca diferite serotipuri de *Salmonella* infecteaza ovarul gainii si trec in ou, inainte de formarea cojii. Daca este asa, inseamna ca pastrarea la frigider, decontaminarea cojii inainte de consum, sunt masuri inutile in prevenirea salmonelozelor.

Shigeloza. Membrii genului *Shigella* au fost pentru prima data descrisi de cercetatorul japonez K. Shiga in 1898 si 2 ani mai târziu, de microbiologul european Simon Flexner. Bacilii incadrati in acest gen infecteaza omul si primatele. Sunt agentii cauzali ai unor tulburari digestive, de la o diaree moderata, pâna la o dizenterie ce poate fi fatala. Dizenteria este un sindrom manifestat prin crampe abdominale puternice si scaune frecvente, de volum mic, mucoide si sanguinolente. Totusi, diareea neinsotita de eliminare de mucus si sânge, este un simptom mai frecvent decât dizenteria si in acest caz termenul de sigeloza este preferat. Sigeloza este determinata de unul din urmatoarele patru serotipuri de *Shigella* – *Sh. sonnei, Sh. dysenteriae, Sh. flexneri, Sh. boydii*, dintre care *Sh. sonnei* este serotipul cel mai frecvent. Omul poate ingera acesti germeni odata cu apa si alimentele contaminate (oua, vegetale, crustacee, produse lactate). Odata patrunsi in intestin, invadeaza celulele epiteliale intestinale si dupa 2 - 3 zile enterotoxinele produse determina un efect de eliminare a apei din celule. Infectia intestinului subtire se caracterizeaza printr-o diaree apoasa, in timp ce infectia intestinului gros determina eliminarea de scaune mucoide si sanguinolente, caracteristice dizenteriei. Majoritatea cazurilor de sigeloza evolueaza aproximativ o saptamâna, fara complicatii. Totusi, pacientii care pierd o mare cantitate de lichid, trebuie rehidratati, existând riscul unui colaps circulator, mai ales la copii si adultii debilitati. Antibioticele sunt uneori eficiente, dar alteori infectiile cauzate de tulpini de *Shigella sp.* purtatoare de plasmide R care le confera adesea multirezistenta la antibiotice, pot fi fatale. Cei care supravietuiesc, ramân purtatori pentru o luna sau mai mult, continuând sa elimine germeni prin materiile fecale. Nu exista un vaccin protector.

Diagnosticul clinic este confirmat de diagnosticul bacteriologic, realizat prin izolarea si identificarea agentului patogen, din scaunul pacientului, pe mediu selectiv *Salmonella – Shigella.*

Aeasta bacterie fost una dintre primele bacterii patogene pentru care s-a demonstrat un un efect de inducere a apoptozei macrofagelor, proprietate asociata de obicei cu capacitatea bacteriilor patogene de depresie a raspunsului inflamator al gazdei pe care o invadeaza.

Identificarea agentului patogen urmeaza etapele obisnuite :

1. Examenul microscopic al culturilor in mediu lichid pe preparate proaspete L/l, pentru evidentierea mobilitatii;
2. Examenul caracterelor de cultura pe medii selective (solide) ;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

3. Examenul microscopic pentru evidentierea proprietatilor morfo-tinctoriale, dupa efectuarea de frotiuri colorate prin metoda Gram si prin metode selective pentru evidentierea tulpinilor capsulate;
4. Testarea proprietatilor biochimice in scopul identificarii agentilor patogeni, numita si *biotipizare*. Dintre toate posibilitatile de tipizare si identificare taxonomica, biotipizarea este accesibila majoritatii laboratoarelor si in acelasi timp mult utilizata deoarece proprietatile biochimice ale bacteriilor sunt determinate de determinanti genetici cromozomali, astfel ca sunt mai stabile decât alte caractere determinate de existenta plasmidelor. Biotipizarea poate fi realizata in practica laboratorului clinic cu ajutorul sistemelor biochimice de identificare care au inregistrat o evolutie in timp de la aparitia lor si pâna in prezent, alegerea sistemului fiind in functie de posibilitatile laboratorului considerat:

a) **Sisteme conventionale** sau **de referinta**, efectuate individual: 1 test/ tub sau placa; in prezent sunt utilizate metode cromogene cum ar fi cea pentru testul oxidazei, care se efectueaza inaintea altor teste biochimice, toate enterobacteriile fiind oxidazo-negative (fig.); testele individuale se practica si ca teste suplimentare ale celorlalte sisteme, atunci când rezultatele acestora sunt neconcludente ;

b) **Sisteme de identificare biochimica multitest**, care utilizeaza medii speciale in volume mici (tuburi de hemoliza) si care permit efectuarea si interpretarea mai multor teste biochimice in acelasi tub. Mediile multitest utilizate pentru identificarea enterobacteriilor sunt: TSI si MILF. **Mediul TSI** (triple sugars iron) permite interpretarea a 4 teste biochimice: fermentarea glucozei +/- gaz; producerea de H_2S; fermentarea lactozei si a zaharozei (vezi Cap. Diagnosticul microbiologic, fig. 56, C);
Mediul MILF (mobilitate; indol; lizin decarboxilaza; fenilalanina-dezaminaza).

Aceste doua tipuri de medii permit efectuarea a 8 teste biochimice (4 + 4); acestea se asociaza cu 2 teste individuale, respectiv cu testul ureazei (reactia Christensen) si testul utilizarii citratului ca unica sursa de C (reactia Simmons). Deci in total se realizeaza 10 teste biochimice a caror interpretare se face tabelelor de identificare (Anexa VII - tabel nr. 13) pentru enterobacterii si doar in situatia in care rezultatele anumitor teste sunt incerte se procedeaza la realizarea unor teste suplimentare (individuale), prin a caror asociere eficienta acestor sisteme poate fi crescuta.

c) **Sisteme microtest**, care se efectueaza in microvolume si asociaza un numar mare de

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

teste in aceeasi placa/tub, fiind de regula suficiente pentru a realiza o identifcare precisa. Cele mai utilizate sisteme microtest pentru identificarea enterobacteriilor sunt API 20E, Rapid ID 32 E, Enterotube II, Micro-ID, MicroScan.

API 20E reprezinta un sistem de identificare performant care permite identificarea unui procentaj inalt de specii bacteriene in 18 – 24 ore, fara a necesita determinarea unor caracteristici fiziologice suplimentare. Sistemul reprezinta o versiune miniaturizata a procedurilor conventionale pentru identifcarea enterobacteriilor si a altor bacterii Gram negative (etapele de lucru sunt schematizate in fig.57).

Sistemul este insotit de un catalog de identificare. Firma producatoare furnizeaza in prezent si un program computerizat de interpretare a rezultatelor si de identificare taxonomica a speciilor de enterobacterii, ca si a speciilor apartinând altor grupe de microorganisme de interes medical, gradul de corectitudine al identificarii crescând foarte mult.

5) Testarea proprietatilor serologice ale tulpinii bacteriene izolate; se fac teste calitative pe lama pentru antigenele O (fig.60) si cantitative in tub pentru antigenele O si H, pentru evidentierea si titrarea antigenelor bacteriene cu scopul serotipizarii tulpinilor izolate si realizarii unor studii de epidemiologie. Identificarea biochimica a unor tulpini de *Salmonella*, *Shigella* si *E. coli* din gastroenterite, trebuie considerata o identificare prezumtiva si trebuie confirmata serologic.

6) Determinarea sensibilitatii la bacteriofagi (lizotipizare – fig.61).

7) Determinarea sensibilitatii la substante antibiotice (determinarea antibiotipului) prin metoda difuzimetrica, in varianta care utilizeaza discuri de antibiotice (metoda Kirby – Bauer, fig.59).

Microbiologii sunt in prezent alertati de emergenta enterobacteriilor care prezinta rezistenta multipla la antibiotice. Unul din mecanismele prin care rezistenta poate apare la tulpini anterior sensibile este transferul fara bariere de specie si gen al plasmidelor R, transfer ce se face cu multa usurinta in intestin unde densitatea populationala a enterobacteriilor este foarte mare, dar este demostrat ca se pote realiza si in mediul extern, de exemplu in sedimentele acvatice. Bacteriile Gram negative enterice poseda in mod obisnuit o singura plasmida mare care codifica rezistenta la cateva antibiotice. De exemplu, la *K. pneumoniae* gene care codifica sinteza β-lactamazei, gene care codifica factori de virulenta pentru sideroforul aerobactina si operonul cf29, care codifica o adezina nefimbriala CF29K (implicata in fenotipul difuz de aderenta), se gasesc pe o plasmida conjugativa.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tulpini ale genurilor *Enterobacter, Serratia, Klebsiella* si *Providencia*, adaugate la tulpinile de *Proteus* indol-pozitive si tulpinile de *E.coli* rezistente la cephalotin, poseda β-lactamaze inductibile care confera rezistenta la mai multe antibiotice β-lactamice. Enzimele inactivatoare sunt adesea determinate cromozomal si pot fi responsabile pentru marea rezistenta la pacientii care au fost tratati pentru septicemie.

Metoda discurilor pentru determinarea sensibilitatii poate sa nu detecteze intotdeauna tulpinile rezistente, mai ales cand se testeaza cefalosporinele, astfel ca se recomanda utilizarea metodei dilutiilor si metoda E test (fig.46). Detectarea tulpinilor rezistente este importanta pentru pacient, dar si pentru monitorizarea infectiilor nosocomiale.

Diagnosticul socului endotoxic. Socul endotoxic este o manifestare potential letala a infectiilor cu bacterii Gram negative, inclusiv cu enterobacterii. Endotoxina este un complex farmacologic activ, reprezentat de lipopolizaharidele (LPS) continute in peretele celular al bacteriilor Gram negative. LPS sunt tristratificate, stratul extern fiind constituit din hidrati de carbon variabili ca stuctura, care determina specificitatea antigenica (Ag O), extrema in cazul genului *Salmonella* (peste 2000 serotipuri). Stratul median este un miez polizaharidic asemanator la diferite specii, iar stratul intern are o structura inalt conservata, fiind reprezentat de lipidul A. Efectele biologice la LPS au fost demonstrate experimental injectant i.v. mici cantitati la animale, la care determina febra, leucopenie, hemoragii capilare, hipotensiune, colaps circulator, simptome care sunt in mare masura aceleasi cu cele observate la pacientii cu infectii septicemice cu bacterii Gram negative.

Testul cu lizat de limulus (care utilizeaza un reactiv preparat din amibocite ale crabului in forma de potcoava – *Limulus poliphemus*), a fost folosit cu rezultate variabile in diadnosticul socului endotoxic. Lizatul sufera un proces de gelificare cand vine in contact cu cantitati foarte mici, chiar urme de endotoxina.

Mai promitatoare in diagnosticul septic cu Gram negativi este utilizarea anticorpilor monoclonali, in tehnica ELISA sau alte tehnici, prin care se poate detecta lipidul A, pentru ca efectele farmacologice ale endotoxinei sunt atribuite in primul rand lipidului A, care este puternic antigenic si are determinanti comuni tuturor tulpinilor de bacili Gram negativi. Astfel detectarea lipidului A circulant la pacientii cu septicemie cu Gram negativi poate stabili diagnosticul si o terapie prezumtiva poate fi inceputa inainte ca organismul determinant al infectiei sa fie izolat si identificat.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Haemophilus sp.

In 1892, Richard Pfeiffer a izolat un bacil de dimensiuni mici, Gram negativ, capsulat, pe care l-a considerat agentul cauzal al gripei (*influenza*). Datorita acestei relatii si preferintei pentru mediile cu adaos de sânge (*haemo-philus*) organismul a fost denumit *Haemophilus influenzae*. Totusi, in timpul marii epidemii de gripa din 1918 – 1919, bacilul lui Pfeiffer a fost considerat ca o cauza secundara a bolii, iar gripa propriu-zisa a fost considerata a fi determinata mai curând de un virus, decât de o bacterie.

In 1917, Davis a descris doi factori de crestere esentiali pentru bacteriile care determinau o boala influenza-like, unul derivat din hemoglobina si un altul derivat din relatia de apropiere (satelita) cu *Staphylococcus aureus*. In 1921, Thjotta si Avery au desemnat factorul de crestere derivat din sânge ca *factor X*, iar pe celalalt ca *factor V*. Mai târziu, Lwoff a identificat factorul X ca fiind *hemina* si factorul V ca fiind *NAD* (nicotinamida dinucleotid). Factorul X din hemina a fost mai târziu identificat ca *protoporfirina* sau *protohem*. Nevoia de unul dintre acesti factori sau de ambii, alaturi de reactiile hemolitice pe mediu solid cu adaos de sânge de cal furnizeaza mijloace obiective de identificare a speciilor de *Haemophilus*. Metoda se bazeaza pe urmatorul principiu: mediul de cultura care contine infuzie de cord bovin suplimentat cu factori de crestere, se repartizeaza in placi compartimentate in 4 sectoare sau cadrane; cadranul I este suplimentat cu hemina (factor X), cadranul II cu NAD (factor V), cadranul III este suplimentat cu ambii factori, iar cadranul IV este suplimentat cu NAD si contine de asemenea si sânge de cal, ca sursa de hemina si pentru demonstrarea proprietatilor hemolitice ale speciilor de *Haemophilus*. Necesitatile pentru factori de crestere sunt demonstrate de cresterea sau absenta cresterii in fiecare cadran.

Sunt bacterii cu caractere comune morfo-tinctoriale si biologice, care se diferentiaza prin aceste exigente nutritive (pentru factorii de crestere X si V), ca si prin caractere de patogenitate, biochimice si structura antigenica.

Speciile de hemofili de la om care necesite ambii factori de crestere (X,V):
- *Haemophilus influenzae;*
- *H. haemolyticus;*
- *H. aegipticus* = *H. conjunctivalis* – specie izolata de Koch in 1883;

Specii dependente numai de factorul de crestere X:
- *H. aphrophilus;*
- *H. ducreyi;*
- *H. vaginalis* = *Gardnerella vaginalis;*

Specii dependente numai de factorul de crestere V:
- *H. parainfluenzae;*
- *H. parahaemolyticus;* + reactie de β-hemoliza ;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- *H. paraphrophilus;*
- *H. segnis.*

Acesti germeni fac parte din microbiota normala a orofaringelui , fiind omniprezenti in aceasta nisa ecologica a acestuia, reprezentând ~ 10% din microbiota totala a acestui habitat (din care 10% - *H. haemolyticus*, 90% - *H. parainfluenzae*); sunt prezenti si placa dentara.

Patogenie. Colonizarea tractului respirator superior poate fi urmata in anumite conditii de diseminarea continua spre urechea medie, sinusuri, plamâni, facilitata de viroze respiratorii si exacerbata de boli alergice asociate. Ca si in cazul altor comensali, capacitatea de aderenta la epiteliul cailor respiratorii este o etapa fundamentala in procesul de colonizare si este mediat de structuri din categoria adezinelor.

Hemofilii sunt deci agenti conditionat patogeni care produc o gama larga de infectii , variate ca localizare, frecventa , gravitate. Cele mai frecvente infectii pot fi: epiglotita, pneumonia, celulita fetei, endocardita, pericardita, artrita, meningita, bacteriemii, septicemii; hemofilii pot ajunge si accidental in sânge, colon si apendice (de ex. *H. segnis* poate fi agentul cauzal al apendicitei).

Alte tipuri de infectii mai putin frecvente: abcese cerebrale, musculare, cutanate, osoase; mastoidite, otite, conjunctivite, sinuzite; infectii dentare si gingivale, faringiene; laringite, traheite, bronsite, abcese pulmonare, pleurezii; colici digestive, hepatite, apendicite, peritonite; cistite, uretrite; epididimite, vaginite, endometrite; infectii ale plagilor si grefelor.

Haemophilus influenzae este considerat in prezent ca o cauza relativ putin frecventa a infectiilor tractului respirator, acestea aparând in special ca o complicatie a unei boli anterioare. De asemenea, in ultimii ani *H. influenzae tip b* a atras atentia ca un important agent cauzal a meningitei la copii cu vârsta cuprinsa intre 6 luni si 2 ani. Agentul patogen poate trece din tractul respirator, in sânge si apoi spre meninge, determinând meningita cu *Haemophilus*. Simptomele bolii includ rigiditatea gâtului, durere de cap severa si alte simptome care dovedesc implicatea neurologica, cum ar fi: lipsa de atentie, toropeala si iritabilitate. Boala are o rata de mortalitate de 5 %. In tratament se utilizeaza combinatii de antibiotice care includ si rifampicina, deoarece marea majoritate a tulpinilor sunt rezistente si plurirezistente la antibiotice.

Specia *H. ducreyi* determina infectii cu transmitere sexuala si leziuni consecutive ale mucoasei genitale (sancru moale sau leziune sancroida). La inceputul infectiei apare o papula moale inconjurata de o zona ingusta de eritem, care evolueaza repede spre formare de puroi si apoi la leziune ulceranta superficiala, cu margini neregulate si moi (sancru moale), ceea ce permite diagnosticul clinic diferential fata de sancrul sifilitic; in plus, leziunea sângereaza usor si

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

este extrem de dureroasa, semne clinice care de asemenea diferentiaza aceasta leziune de sancrul sifilitic. Diagnosticul definitiv depinde insa de izolarea agentului patogen din leziune ; la examinarea microscopica a unui frotiu executat din produsul patologic se poate evidentia uneori o grupare de bacili in «lant de bicicleta », caracteristica acestei specii. *H. ducreyi* este sensibil la tetraciclina, eritromicina, dar adesea boala se poate vindeca spontan.

*Gardnerella vaginalis (*specie anterior numita *Haemophilus vaginalis)* poate fi un comensal al vaginului (dar prezenta sa in populatie este foarte inegala), care se poate comporta ca un patogen oportunist, generând infectii numite vaginite, si in astfel de cazuri patogenul se poate transmite si prin contact sexual. Cel mai pregnant simptom este un miros intens. Germenul este sensibil la tetraciclina.

Diagnosticul bacteriologic

1. Izolarea din produse biologice care sunt normal sterile: LCR, sânge, urina;
2. Izolarea din exudate formate in cursul proceselor infectioase ale cavitatilor inchise : sputa, lichid pleural, lichid peritoneal;
3. Izolarea din secretii, colectii purulente formate in cursul unor procese infectioase (otice, sinusale, conjunctivale, uretrale, genitale).

Interpretarea rezultatelor. Examenul este considerat pozitiv daca se izoleaza din nisa ecologica respectiva un numar de peste 10 milioane germeni/ml, prezenti concomitent cu o manifestare clinica. Identificare biochimica – cu trusa *API NH* (2 ore de incubare). Examen serologic - semnificativa cresterea titrului Ac de 4x in 10-14 zile.

Gardnerella vaginalis – bacterie facultativ Gram variabila, agent cauzal al vaginozei bacteriene. Determina un miros puternic al secretiei vaginale si aparitia unor celule "indicatoare" ale acestei infectii - celule epiteliale vaginale, inconjurate de bacterii. Testul "Whiff" – test al mirosului secretiei vaginale tratate cu o solutie de KOH 10 %, care degaja un miros patrunzator de peste. Totusi, acest test poate fi pozitiv si in trichomoniaza (parazitoza). Agentul patogen este sensibil la metronidazol.

Bordetella sp.

Speciile acestui gen se prezinta sub forma unor cocobacili Gram negativi, cu lungimea de 0,2 – 0,5 μm, izolati sau formând lanturi scurte (de 2 - 3 celule), izolati pentru prima data de Jules Bordet si Octave Gengou in 1906, cunoscuti ca bacili Bordet – Gengou. Se numara printre agentii patogeni cel mai dificil de izolat si cultivat, fiind necesare tehnici speciale.

Specii mai frecvent izolate sunt: *B. pertussis, B. parapertussis, B. bronchiseptica.*

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

B pertussis, specia reprezentativa a genului, este agentul etiologic al tusei convulsive. Sunt bacterii strict aerobe, se dezvolta la 35 – 37 °C, nu fermenteaza zaharurile, nu lichefiaza gelatina, nu produc indol si H_2S.

Metode de cultivare si caractere de cultura. Tulpinile acestei specii sunt dificil de izolat si cultivat datorita exigentelor nutritive, necesitând medii nutritive bogate in aminoacizi , vitamine, ca si prezenta unor agenti reducatori (fier feros, glutation), saruri minerale (cloruri, fosfati), substante neutralizante ale inhibitorilor de crestere. *B. pertussis* este inhibat de o serie de constituenti comuni ai mediului, cum ar fi: acizi grasi, ioni metalici, sulfuri si peroxizi. In mediul de izolare trebuie adaugate substante protectoare: amidon, carbune activ, albumina serica, sânge s.a. Mediul de crestere de electie este mediul Bordet – Gengou , care contine macerat de cartof glicerinat, gelozat, cu adaos de sânge. Dupa insamântarea pe acest mediu, dupa 2 – 5 zile de incubare la 37°C, *B. pertussis* formeaza colonii mici, convexe, usor transparente, cu luciu metalic si inconjurate de o zona de hemoliza difuza. Coloniile sunt foarte aderente la mediu. Aceasta bacterie are o slaba rezistenta in mediul extern (mai putin de 2 h la temperatura camerei), astfel ca probele patologice suspecte necesita o prelucrare rapida dupa prelevare. Tulpinile sunt sensibile la eritromicina, tetraciclina, cloramfenicol.

Factori de virulenta: *hemaglutinina filamentoasa (PHA)* care aglutineaza *in vitro* hematiile de om, soarece, iepure, gaina, iar *in vivo* actioneaza ca adezina, mediind aderenta la epiteliul ciliat al cailor respiratorii; *pertactina* – o proteina de 69 kDa care mediaza aderenta la celulele de mamifer, *PT (pertussis toxin)* – o toxina termolabila, care determina dermatonecroza la cobai si iepure. Aceasta toxina poate inhiba anumite functii fagocitare si poate contribui astfel la supravietuirea intracelulara a bacteriilor. Exprimarea simultana a factorilor de virulenta produsi de *B. pertussis* este controlata de locusul *bvg (vir)*. Fiind bacterii Gram negative sunt prezente si endotoxinele (LPS), cu efect pirogen .

Caractere antigenice. Toate tulpinile speciilor de *Bordetella* prezinta antigenul somatic "O" (LPS), termostabil, cu aceeasi structura la toate speciile. Este prezent si un antigen de invelis, tip "K", termolabil, alcatuit din mai multe fractiuni antigenice notate de la 1- 14. Toate speciile genului *Bordetella* au un antigen comun - antigenul K7, dar fiecare specie contine si câte un factor antigenic major, specie-specific. Pentru *B. pertussis* acesta este K1; *B parapertussis* – K14; *B. bronchiseptica.*– K12. Factorii antigenici comuni intre specii explica reactiile serologice incrucisate. Antigene flagelare "H" sunt prezente la specia mobila *Bordetella bronchiseptica.*

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Patogenitate. Sunt bacterii inalt patogene care se localizeaza si se multiplica la nivelul epiteliului ciliat din mucoasa traheo-bronsica, fara a invada straturile de celule subiacente. Modificarile patologice apar la distanta, datorita difuziei unor factori produsi in cursul multiplicarii. Speciile *B. pertussis* si *B. parapertussis* sunt patogene doar la om si determina boala numita tuse convulsiva, o boala infecto-contagioasa a copilariei, a carei incidenta a scazut mult datorita vaccinarii in masa. Rar poate aparea si la adult. Agentul patogen se transmite pe cale aerogena, prin picaturile Pflugge de la individul bolnav, aflat in stadiul cataral al bolii.

Sindromul clasic de tuse convulsiva incepe dupa 7- 10 zile de incubare, cu perioada prodromala, numita stadiu cataral, caracterizat prin simptome sistemice nespecifice si respiratorii. Tusea incepe cu accese sporadice si progreseaza in 1– 2 saptamâni la stadiul paroxistic, când accesele de tuse sunt frecvente si produc un sunet caracteristic, datorat unei inspiratii fortate, glota fiind partial inchisa. In aceasta perioada apare limfocitoza.

Odata depasit stadiul paroxistic (dupa circa o saptamâna), numarul germenilor eliminati scade. Concomitent scade si probabilitatea izolarii agentului patogen din probele patologice analizate, desi tusea poate persista câteva saptamâni sau luni de zile. Specia *B. parapertussis* determina o forma de tuse convulsiva cu simptomatologie redusa, agentul patogen fiind rar izolat in laborator. Testarea serologica a populatiei arata ca aprox. 40% dintre indivizi au avut tuse convulsiva cu acest agent patogen. Infectia mixta cu *B. pertussis* si *B. parapertussis* are ca efect intensificarea simptomului de tuse.

B. bronchiseptica este doar ocazional izolata de la omul cu infectii respiratorii sau ale plagilor (0,1 %) si mai frecvent de la animale: iepuri, cobai, maimute (rezervorul de infectie fiind sobolanii si pisicile). Este un bacil Gram negativ, tipic nefermentativ, obligat aerob si care produce alcalinizarea mediilor de cultura. Aceasta specie a fost izolata si de la purtatori. Au fost raportate cazuri simptomatice, cu manifestari medii de tuse (*pertussis- like*), la ingrijitorii de animale, dar si cazuri grave de bronhopneumonie si septicemie la alcoolicii malnutriti, de pneumonie la pacientii cu boala SIDA, de pneumonie si bacteriemie la cei care au suferit un transplant de maduva osoasa, ceea ce evidentiaza caracterul conditionat-patogen al acestei specii.

Sindromul de tuse convulsiva (= *sindrom pertussis*) nu se distinge din punct de vedere clinic de boala tipica, totusi examenul bacteriologic nu confirma o infectie de etiologie bacteriana, acest sindrom fiind adesea determinat de adenovirusuri. In unele cazuri infectia este mixta: bacteriana si virala. Numarul mare de infectii atipice impune cu necesitate stabilirea unui diagnostic diferential prin metode specifice si nu prin teste nespecifice; de exemplu, hemoleucograma indica leucocitoza cu limfocitoza, ori limfocitoza la sugari este fiziologica.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Diagnosticul de laborator

- **bacteriologic** - urmareste izolarea si identificarea agentului patogen din secretia traheo-bronsica de la bolnavii suspecti clinic de tuse convulsiva. Rata de izolare a agentului patogen in prima saptamâna de boala este de 90%, dar scade treptat, fiind mai redusa de 20% in a patra saptamâna de la debutul bolii. Examenul fals negativ se poate datora si inceperii tratamentului cu antibiotice.

Prelevarea produsului patologic se poate face prin 2 metode: metoda placii tusite si metoda tamponului naso-faringian. Metoda placii tusite da rezultate bune in perioada catarala a bolii, când numarul germenilor eliminati odata cu picaturile de saliva in cursul unui acces de tuse este foarte mare. O placa Petri cu mediu Bordet-Gengou este expusa la 20 cm de gura bolnavului care tuseste. Recoltarea se face dimineata pe nemâncate. Metoda este avantajoasa deoarece mediul de cultivare este in acelasi timp si mediu de transport si conservare a viabilitatii bacteriilor. Cele 3 specii specii pot fi diferentiate net dupa caracterele fenotipice. *B. bronchiseptica* este mobila, datorita prezentei unor flageli peritrichi. *B. pertussis* si *B. parapertussis* sunt imobile. *B. pertussis* necesita medii speciale de crestere, in timp ce *B. parapertussis* creste pe medii uzuale.

Identificare biochimica – cu trusa API 20 NE (pentru bacili Gram negativi non-enterici).

Aceste trei specii nu pot fi diferentiate genotipic prin teste de hibridizare, deoarece gradul de omologie interspecie a moleculelor de ADN este foarte mare.

- **serologic** - se face printr-o reactie de aglutinare in tuburi, pentru evidentierea in serul bolnavilor a anticorpilor aglutinanti anti-pertussis sau anti-parapertussis. Testul este util in conditiile in care izolarea germenilor se face mai dificil, dar are valoare retrospectiva, deoarece anticorpii aglutinanti sunt decelabili dupa 2 saptamâni de la debutul bolii. Testul se executa atât cu antigen pertussis, cât si cu antigen parapertussis, lucrându-se in aceeasi sedinta 2 seruri izolate de la acelasi bolnav, recoltate la interval de 21 de zile, pentru a determina cresterea in dinamica a anticorpilor. Metoda este foarte sensibila si foarte specifica. Deoarece populatia infantila este imunizata prin vaccinare, diagnosticul serologic este considerat semnificativ, daca titrul anticorpilor anti-pertussis creste de cel putin 4 ori, de la prima la a doua determinare.

La indivizii neimunizati si netratati cu antibiotice, infectia poate persista mult timp.

Legionella pneumophila

Acest agent patogen a fost descoperit in imprejurari dramatice : in iulie 1976, intr-un hotel din Philadelphia, 140 de participanti la Conventia Anuala a Legiunii Americane din Pennsylvania, ca si alte 72 de persoane din hotel sau din jurul hotelului, s-au imbolnavit,

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

prezentând simptome ca : febra, tuse, pneumonie. S-au inregistrat 34 de decese din cauza acestei boli si a complicatiilor sale. Prima ipoteza care incerca sa explice etiologia acestor infectii, a fost cea referitoare la un val epidemic de gripa. De-abia in ianuarie 1977, cercetatorii au anuntat izolarea din tesutul pulmonar al unui pacient, a unei bacterii necunoscute anterior. S-a stabilit ca aceasta bacterie era responsabila pentru « boala legionarilor » sau legioneloza, asa cum avea sa fie denumita, ca si pentru un numar de boli pneumonia-*like*, nediagnosticate anterior si chiar epidemii nerezolvate.

Legionella pneumophila, agentul etiologic al legionelozei este o bacterie Gram negativa, bacilara, mobila, de dimensiuni mici (0,3 – 0,9μm/ 2 – 4 μm), desi formele filamentoase pot atinge 20 – 40 μm.; este strict aeroba (crestere stimulata de prezenta a 2,5% CO2), nesporulata, necapsulata. Este prezenta in general acolo unde se colecteaza apa ; aparent este un patogen transmisibil pe cale aerogena, dar de fapt se transmite prin picaturile mici de apa, din aerul brizei, de lânga torenti ; legionelele pot fi prezente si in instalatiile de aer conditionat si de apa calda (se pot dezvolta la temperaturi de 35 – 45°C), ca si in apele stagnante (lacuri, balti).

Legionelele sunt dificil de cultivat in laborator, necesitând medii cu hemoglobina si aminoacizi. In mediul natural se pare ca supravietuiesc datorita unor factori de crestere produsi si eliminati in mediul acvatic de catre cianobacterii. S-a demonstrat ca legionelele supravietuiesc in ape si incluse in protozoare (amibe). Rezista la temperaturi cuprinse intre 0 – 56°C si la pH acid. Sunt distruse prin expunere la 58°C, timp de 30 minute. Sunt sensibile la dezinfectanti care elibereaza clor, astfel ca prin procedeul de clorinare a apei se evita raspândirea legionelelor. Sunt sensibile de asemenea, la fenol, formol, alcool de 70° si compusi cuaternari de amoniu.

Patogenie. Picaturile de apa contaminate patrund prin caile respiratorii umane ; perioada de incubatie este de câteva zile ; simptomele legionelozei : febra, tuse seaca eventual cu putina sputa, posibil diaree si voma; legionelele sunt patogeni oportunisti. Legionelele sunt sensibile *in vitro* la numeroase antibiotice, dar nu se pot utiliza decât cele care patrund in macrofage, datorita multiplicarii intracelulare a agentului patogen ; tratamentul i.v. cu eritromicina este eficient. Transmiterea de la persoana la persoana este neobisnuita. In afara de forma clasica, acuta a legionelozei, exista si o forma benigna, numita « febra de Pontiac », caracterizata prin perioada de incubatie scurta (36 ore),, absenta atingerii pulmonare si vindecare spontana.

Caractere biochimice. Legionelele sunt catalazo-pozitive, sunt proteolitice (hidrolizeaza gelatina). Nu metabolizeaza hidratii de carbon, nu reduc nitratii si nu hidrolizeaza ureea. O caracteristica a genului *Legionella* este prezenta unui procent mare in structura peretelui celular a

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

acizilor grasi ramificati (90% din totalul acizilor grasi) cu 14 –17 atomi de carbon, cu profiluri caracteristice pentru diferitele specii.

Persistenta legionelelor in instalatiile de apa si aer conditionat, pe dispozitive medicale, se explica printr-o mare capacitate de aderenta la metale, care le stimuleaza si cresterea (fier, zinc, aluminiu). Apar probleme majore in contextul sanatatii publice, care privesc distributia apei potabile prin conducte pe care se formeaza biofilme bacteriene. In sistemele de distributie unde se formeaza aerosoli inhalabili (sisteme de aer conditionat, dusuri cu apa fierbinte- apa calda nefiind clorinata) pot fi prezente in biofilme si agentul patogen al "bolii legionarilor", considerat factor de biohazard (*biohazard infections).*

Diagnosticul de laborator

Diagnostic bacteriologic

Se izoleaza pe mediul **BCYE** (*Buffer Charcoal Yeast Agar*), care contine carbune, extract de drojdii, L-cisteina, pirofosfat feric si agar. Perioada de incubare 3 – 7 zile. Coloniile sunt pigmentate in gri, lucioase, polimorfe, cu aspect caracteristic de geam crapat, la examinarea cu lupa. Se coloreaza in rosu prin metoda Gimenez si in albastru prin metoda Giemsa.

Studiul proprietatilor metabolice (testul catalazei, al hidrolizei gelatinei, ureei, al reducerii nitratilor, al fermentatii zaharurilor).

Diagnostic imunologic

In urina pot fi evdentiate antigene solubile specifice legionelelor, prin latex aglutinare, ELISA, RIA.

Legionelele se evidentiaza in produsele patologice (aspirat bronsic) si in culturi prin imunofluorescenta directa .

Metode moleculare: utilizarea de sonde nucleotidice si a metodelor de amplificare genica.

Fig. 30. Legionella pneumophila, evidentiata prin metoda imunofluorescentei in produs patologic (aspirat bronsic) (marire: 400x).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Brucella sp. Speciile genului *Brucella* includ bacterii Gram negative, in forma de cocobacili, paraziti facultativ intracelular ai sistemului reticulo-endotelial la animale, de la care pot fi transmisi si omului.

Patogenie. Brucelele sunt agentii patogeni ai unei antropozoonoze, numita bruceloza. Specia reprezentativa a genului este *B. abortus* , parazita la bovine. Aceasta specie manifesta histotropism pentru organele genitale interne si are o afinitate deosebita pentru un component glucidic – *erythritol* , prezent in concentratie semnificativa in placenta bovina, nu si umana. Se poate localiza si in glandele mamare de la vacile infectate. *Brucella sp.* produce leucopenie marcata, prin efect direct asupra maduvei hematogene ;

B. melitensis infecteaza caprele si determina boala cunoscuta si sub numele de „febra de Malta" sau „febra mediteraneana", raspândita in tarile mediteraneene si in Orientul Mijlociu. Agentul patogen poate fi prezent si in brânza de capra. Infecteaza sistemul reticulo-endotelial, maduva osoasa, ficatul, splina si alte situsuri inaccesibile fagocitelor circulante, astfel ca infectiile determinate de acest agent patogen se cronicizeaza. Alte specii: *B. canis* , *B. suis* ale caror gazde sunt câinele, respectiv porcul.

Rezervorul de infectie este reprezentat de mamiferele domestice, la care agentul patogen se transmite prin aerosoli sau contact su secretii contaminate. Omul se poate infecta direct din rezervorul natural, pe cale cutanata (leziuni minime la nivelul pielii + contact cu tesuturi, sânge, urina, fetusi avortati, placente, secretii vaginale infectate) si pe cale respiratorie (inhalare de aerosoli) sau indirect, pe cale digestiva prin consum de carne, lapte si produse derivate, netratate sau insuficient tratate termic.

Perioada de incubatie variaza intre 5 - 21 zile, rar o perioada mai lunga, de câteva luni. Sunt frecvente infectiile usoare sau chiar inaparente. Infectiile simptomatice (acute, subacute, cronice) se manifesta prin febra continua sau intermitenta (ondulanta), de durata variabila, cefalee, vomismente, transpiratii, frisoane, artralgii si dureri generalizate. Datorita histotropismului agentului patogen pentru organele genitale, infectia poate determina avorturi spontane la om si animale. Boala poate dura câteva zile, mergând pâna la luni si ani de zile. Bolnavii sunt recuperabili in general, dar ramân cu o usoara slabiciune. Diagnosticul clinic este dificil, datorita absentei unor simptome patognomonice. Se tine cont de datele din anamneza, ca si in cazul diagnosticului de laborator, respectiv de riscul reprezentat de o meserie care presupune contactul cu animalele (ingrijitori de animale, veterinari) sau de consumul de alimente de origine animala dintr-o sursa necontrolata si neavizata din punct de vedere sanitar-antiepidemic. Uneori, prin expunere repetata, se poate produce sensibilizarea acestor persoane fata de antigene brucelice si reactii de hipersensibilitate la *Brucella* (reactii alergice cutanate).

Diagnosticul de laborator.

- **diagnostic bacteriologic** – se bazeaza pe izolarea agentului patogen din sânge, maduva oaselor si alte tesuturi sau din secretiile pacientului, pe medii de cultura imbogatite si care se incubeaza in prezenta a 10% CO_2;
- **diagnostic imunologic** – reactii *in vitro:* reactia de aglutinare pe lama (reactia Huddleson) sau in tub efectuate cu antigen brucelic si ser de la pacientul suspectat de o bruceloza; testul cantitativ in tub, se efectueaza cu seruri perechi, pentru a se observa cresterea in dinamica a titrului anticorpilor; un titru al anticorpilor de minimum 1/160 este semnificativ pentru diagnostic.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

BACILI GRAM NEGATIVI FACULTATIV ANAEROBI INCURBATI

Vibro cholerae

Fam. *Vibrionaceae* – *G. Vibrio* - specia tip ***V. cholerae*** (agentul patogen al holerei)

- *G. Aeromonas*
- *G. Plesiomonas*
- *G. Photobacterium*
- *G. Lucibacterium*

Speciile incadrate in genul *Vibrio* constituie componente ale micropopulatiei acvatice, fiind mai ales germeni habituali ai mediului estuarin si marin. In functie de criteriul halotolerantei, speciile acestui gen se impart in doua categorii:

1) Categoria speciilor care cresc la concentratii de NaCl care variaza intre 0 – 3% si care grupeaza serogrupurile O1, biovar Clasic si biovar El Tor, ca si serogrupurile non-O1 (notate de la 1 la 139). In functie de patogenitate, tulpinile acestei specii se impart in doua grupe: holerigene (O1 si O139) si nonholerigene. Specia *V. mimicus* face trecerea intre vibrionii holerici si speciile halofile. *V. metschinikovii* este singura specie oxidazo-negativa.
2) Categoria speciilor care cresc la concentratii de NaCl care variaza intre 3 – 10%; in acesta categorie sunt incluse 12 specii halofile, dintre care 9 sunt de interes medical, fiind patogene la om, mai frecvent intâlnite fiind: *V. parahaemolyticus, V. alginolyticus, V. costicola.*

Vibrionul holeric a fost izolat pentru prima data in 1883 de catre R. Koch in India, in Delta Gangelui. Pâna in prezent a generat 8 pandemii de holera, ultima in 1992, cu originea tot in India - Madras.

V. cholerae - bacili Gram negativi, drepti sau incurbati (forma de virgula o au doar când frotiul se executa de pe mucoasa intestinala), nesporulati, necapsulati (serogrupul O139 este capsulat), foarte mobili, cu flageli peritrichi sau monotrichi de tip polar in mediu lichid si laterali pe mediu solid. Sunt aerobi, facultativ anaerobi, cu metabolism oxidativ-fermentativ, oxidazo-pozitivi. Tulpinile care apartin biovarului clasic sunt nehemolitice si mai sensibile la clor (spre deosebire de biovarul *V. cholerae* 01 El Tor, care este hemolitic si mai rezistent la clor). Tulpinile acestei specii sunt prezente in mediul acvatic, frecvent asociate cu fito- si zooplanctonul. Sunt patogene pentru animalele acvatice, dar si pentru om, la care pot genera infecti intestinale, dar si extraintestinale, de acestea fiind responsabile serogrupurile non-O1, care pot determina infectii ale plagilor si septicemii.

Caractere de cultura. Cresc bine la pH alcalin (~9) in mediu aerob. In medii lichide formeaza un val la suprafata culturii, pe medii solide formeaza colonii mici, transparente

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

("picaturi de roua"). Vibrionul holeric prezinta doua faze, una flagelata care formeaza colonii de tip "S" si o faza fimbriata care formeaza colonii de tip "R".Sunt rezistenti la saruri biliare, de aceea mediile cu adaos de bila sunt folosite ca medii selective (de ex. mediul de izolare B.S.A.= *bile salts agar*, mediul T.C.B.S.= **t**iosulphate **c**itrate **b**ile **s**ucrose).

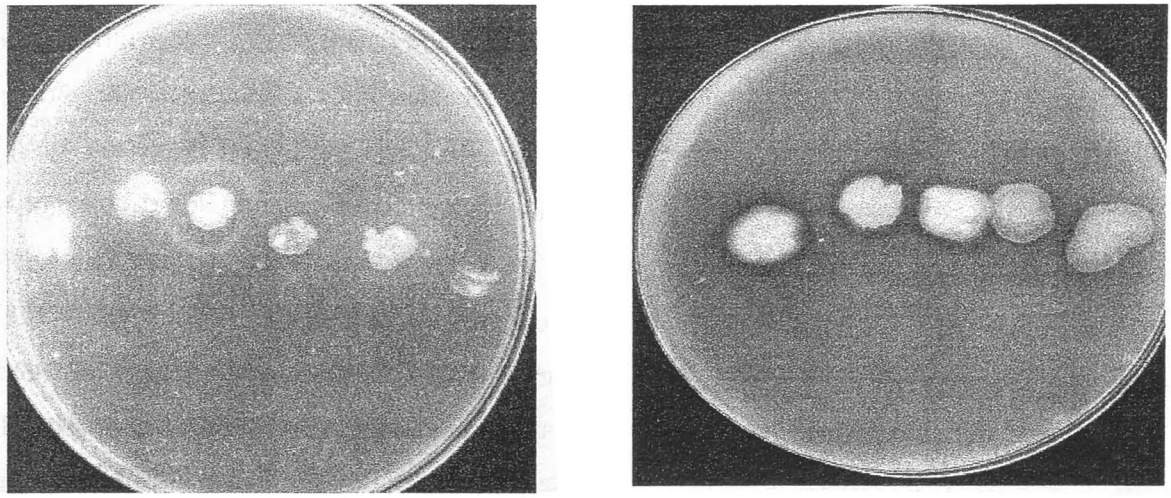
Rezistenta. Serogrupul holerigen O1 grupeaza specii care au o slaba rezistenta in mediul extern, fiind sensibili mai ales la uscaciune, ceea ce explica transmiterea lor pe cale hidrica. Supravietuiesc in ape de izvor, râuri, ape de coasta, golf, mare. Rezista un timp limitat in organismul purtatorilor sanatosi; in materiile fecale, impreuna cu microbiota de asociatie pot trai câteva ore, in conditii de inghetare o luna, in alimente de la câteva ore la cateva zile (in lapte). Sunt extrem de sensibili la aciditatea gastrica, totusi daca doza infectanta este mare, ramâne un numar suficient de mare de vibrioni pentru a coloniza intestinul. Sunt distrusi prin expunere la 50°C timp de 60 min si instantaneu la 100°C. Sunt sensibili la radiatiile solare si UV, la substante antiseptice si dezinfectante (sunt distrusi in 5 min de contactul cu fenol, formol si instantaneu de solutia de sublimat 1‰), ca si la antibiotice de tipul streptomicinei, tetraciclinei, cloramfenicolului si sulfamidelor. Fenomenul de multirezistenta la antibiotice este mult mai putin frecvent, comparativ cu alte bacterii enterice, astfel ca tratamentul nu este precedat de antibiograma. Desi sunt sensibili la antibiotice, cheia tratamentului nu este antibioterapia, ci inlocuirea lichidelor pierdute si reechilibrarea hidroelectrolitica (pe cale parenterala si orala).

Caractere biochimice. Vibrionii sunt oxidazopozivi, fermenteaza glucoza fara producere de gaz. Tipul clasic fermenteaza manoza, zaharoza, arabinoza, in timp ce unele tulpini apartinând biovarului El Tor fermeneaza tardiv lactoza (72 ore) si nu fermenteaza arabinoza. Produc enzime cum ar fi cazeinaza, lipaza (fig. 31). Alte caractere care permit diferentierea tulpinilor serogrupului O1, biovar Clasi si El Tor, sunt prezentate in tabelul nr. 8 .

Tabel nr. 8. Caractere diferentiale ale tulpinilor serogrupului O1, biovar Clasic si El Tor.

Biovar / Caractere	O1	El Tor
Reactia rosu metil	+	-
Reactia Voges Proskauer (VP)	-	+
Hemoliza	-	+
Sensibilitatea la fagul « *IV* »	+	-
Sensibilitatea la fagul « *el 5* »	-	+

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



A. B.

Fig. 31. Teste biochimice caracteristice speciei *Vibrio cholerae* :

A. Testul de evidentiere a cazeinazei; cele 6 tulpini de *V. cholerae* au fost insamântate in spot pe mediu cu cazeina solubila ; tulpina cazeinaza-pozitiva (al 3-lea spot) a hidrolizat cazeina solubila, rezultând cazeinat de calciu care precipita sub forma unui inel, in jurul zonei devenite clare datorita hidrolizei substratului.

B. Testul de evidentiere a lipazei ; cele 5 tulpini de *V. cholerae* au fost insamântate in spot pe mediu cu adaos de TWEEN 80 ; primele 3 tulpini prezinta o reactie pozitiva, evidentiata prin aparitia unui halou clar in jurul coloniilor, iar ultimele doua tulpini sunt lipoza- negative.

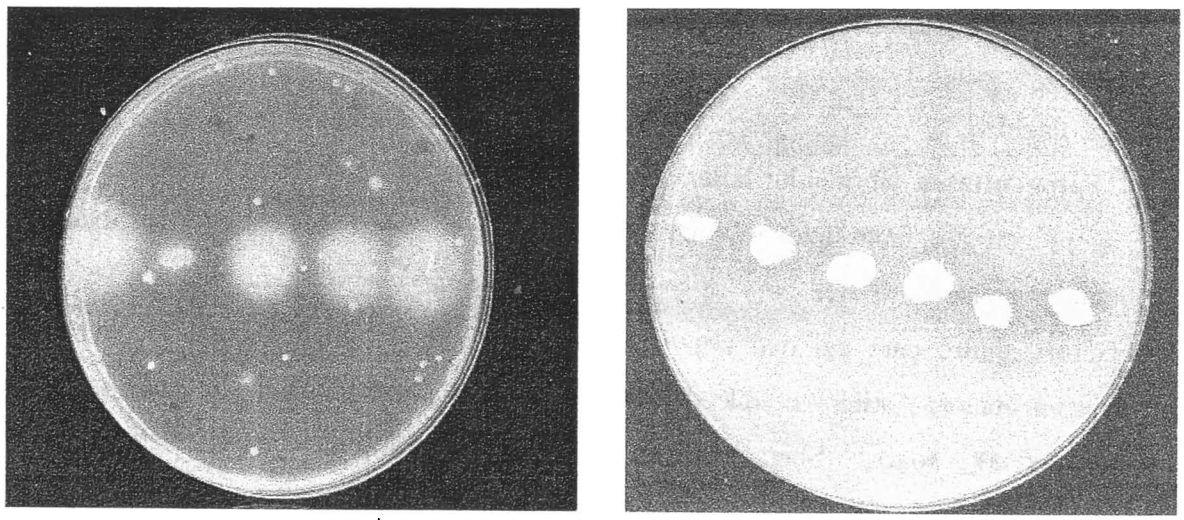
Caractere antigenice. Prezinta antigene somatice O (A,B,C...M), pe baza carora s-au stabilit cele 139 grupuri serologice (serogrupul O1 este strict specific omului si determina holera) si antigene flagelare H.

Patogenitatea vibrionului holeric este determinata de capacitatea mare de multiplicare, acest agent patogen fiind tipic neinvaziv si actionând la poarta de intrare, mai exact asupra epiteliului mucoasei digestive care se exfoliaza. Virulenta acestui agent patogen se datoreaza unor factori, dintre care cei mai importanti sunt toxigeneza si producerea de agresine, din categoria enzimelor. Astfel, tulpinile de vibrioni holerici produc : toxina holerica (care este o exoenterotoxina), toxina Shiga-*like*, neuraminidaza, lecitinaza, DN-aza (fig. 32.A.B), hemolizine. Tulpinile de *V. cholerae* serogrup O1 produc un CAMP-*like* factor, evidentiat prin insamântare in striuri, perpendiculare cu striuri ale tulpinii *S. aureus* ATCC , β hemolitice, efectul actiunii lor sinergice fiind hemoliza completa. (fig. 33, A). Specia *V. parahaemolyticus* produce hemolizina Kanagawa, pe mediu agarizat Wagatsuma, cu adaos de 5% hematii de iepure si cristal violet ca inhibitor al bacteriilor Gram pozitive (fig. 33, B). Hemolizina tip Kanagawa indica prezenta concomitenta la tulpina testata a enterotoxinei, fiind indicatorul cel mai fidel al

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

virulentei tulpinilor de *V. parahaemolyticus*. Recent, s-a demonstrat ca si tulpinile de *V. cholerae* serogrup O1 produc hemolizina Kanagawa (Israil si colab., 2000).

Tabloul clinic al bolii numita holera este de boala diareica secretorie masiva. In cazurile severe bolnavul poate pierde mai mult de un litru de lichid /ora, timp de câteva ore. Lichidul eliminat este incolor, apos, caracteristic (materii fecale cu aspect de «apa de orez »), reflectând o modificare drastica a continutului intestinal. Aceasta modificare este determinata de toxina holerica care este cauza acumularii unei mari cantitati de fluid si electroliti in lumenul intestinal, ca urmare a scaderii reabsorbtiei apei, care are ca efect o diaree profuza, pierderea volumului circulator, acidoza metabolica, depletie de K+, colaps vascular conducând spre *exitus*, in lipsa tratamentului. Bolnavul are pielea ridata, uscata, rece, are crampe musculare in brate si picioare si o sete continua ; chiar in cazul unui consum mare de lichide, acestea nu pot fi retinute, producerea de urina inceteaza, fluxul sanguin spre creier este diminuat, ceea ce explica intrarea in starea de soc si coma. Evolutia bolii este rapida, durând 2 - 7 zile. Cei care se vindeca ramân purtatori timp de 3 – 6 luni (excreta forme fimbriate). Raspunsul imun este slab, infectia fiind localizata la poarta de intrare; la supravietuitori asigura protectie prin anticorpi, timp de 6 – 18 luni.



A. B.

Fig. 32 . Teste de evidentiere a unor factori de virulenta caracteristici speciei *Vibrio cholerae* :

A. Testul de evidentiere a lecitinazei; cele 6 tulpini de *V. cholerae* au fost insamântate in spot pe mediu cu galbenus de ou; lecitinaza bacteriana actioneaza aasupra lecitinei si elibereaza acid oleic, care in prezenta clorurii de calciu precipita sub forma oleatului de calciu, care apare sub forma unui halou opalescent in jurul culturii ; in imagine tulpinile lecitinaza-pozitive sunt cele din spoturile 1, 3, 4, 5.

B. Testul de evidentiere a DN-azei ; cele 6 tulpini de *V. cholerae* au fost insamântate in spot pe mediu solid cu adaos de ADN (Merck) ; In jurul culturilor apar halouri clare, datorita hidrolizei ADN la nucleotide libere (spoturile 5 si 6). Primele 4 tulpini prezinta o reactie negativa, evidentiata prin adaugarea unei solutii de HCl 10% in momentul citirii rezultatelor, care precipita ADN.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Diagnosticul de laborator este bacteriologic, urmarindu-se izolarea agentului patogen pe mediu selectiv hipersalin (1 – 5 % Na Cl); in cazurile de holera, prin insamântarea probei patologice (scaun diareic) se obtine o cultura pura de *Vibrio cholerae*. Se efectueaza frotiuri (care se coloreaza Gram) si testul oxidazei, vibrionul holeric fiind Gram negativ si oxidazo-pozitiv. Identificarea se poate face atât prin teste conventionale, cât si cu ajutorul trusei BioMérieux API 20 E, destinata identificarii enterobacteriilor, ca si altor bacterii Gram negative, API RapiD 20 E (cu perioada de incubare mai scurta - 4 ore), API 20 NE . Tulpinile izolate si identificate sunt testate pentru evidentierea factorilor de virulenta (toxine si enzime).

Epidemiologie. Sursa de infectie o reprezinta omul sau animalul bolnav (vaci, câini, gaini, camila – prin apa contaminata din cocoasa - animalul putând excreta germeni timp de 25 zile de la contaminare). Holera este o boala cu caracter epidemic, epidemia aparând intr-o populatie virgina din punct de vedere imunologic si cuprinde toate grupele de vârsta, dar mai sensibili sunt copiii si batrânii, apartinând grupului sanguin 0. Adultii imunizati (vaccinul antiholeric a fost inventat si aplicat de catre Dr. I. Cantacuzino in Romania in 1913 si a condus scaderea incidentei bolii) sunt rezistenti sau fac infectii asimptomatice. Transmiterea agentului patogen se face prin ape contaminate cu reziduuri fecaloid menajere (este necesara o anumita doza infectanta), alimente contaminate, cum ar fi : crustacee, fructe de mare neprelucrate termic, peste, orez copt, orez cu sos de alune (cel cu sos de rosii nu transmite), inghetata, linte, fasole, nuci de cocos.

Profilaxia. Se face prin masuri sanitare de supraveghere a aplicarii normelor in vigoare si masuri de igiena personala, prin vaccinare la populatia din zonele endemice, ca si la indivizii care calatoresc in aceste zone. Imunizarea se face cu celule moarte si imunoprotectia conferita de acestea dureaza aprox. 6 luni. In 1992 cercetatorii de la Universitatea din Maryland (S.U.A.) au identificat genele care codifica enterotoxina si le-au indepartat din celulele unei tulpini de *V. cholerae*, care au devenit nepatogene. Astfel de vibrioni vii, atenuati, ar putea fi utilizati ca vaccin, obtinându-se o imunoprotectie de lunga durata; un astfel de vaccin se afla in stadiul de testare preliminara introducerii in practica medicala. Tot in faza experimentala se afla si vaccinurile subunitare, reprezentate fie de subunitatea B a toxinei holerice, fie de antigenele O somatice (LPS). Toxina holerica este studiata si pentru o alta proprietate, anume aceea de a creste imunogenitatea vaccinurilor, fiind in prezent cel mai utilizat imunoadjuvant.

O.M.S. apreciaza ca holera face anual 5 milioane de victime, ceea ce justifica eforturile care se fac pentru profilaxia acestei boli cu caracter epidemic.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

A. B.

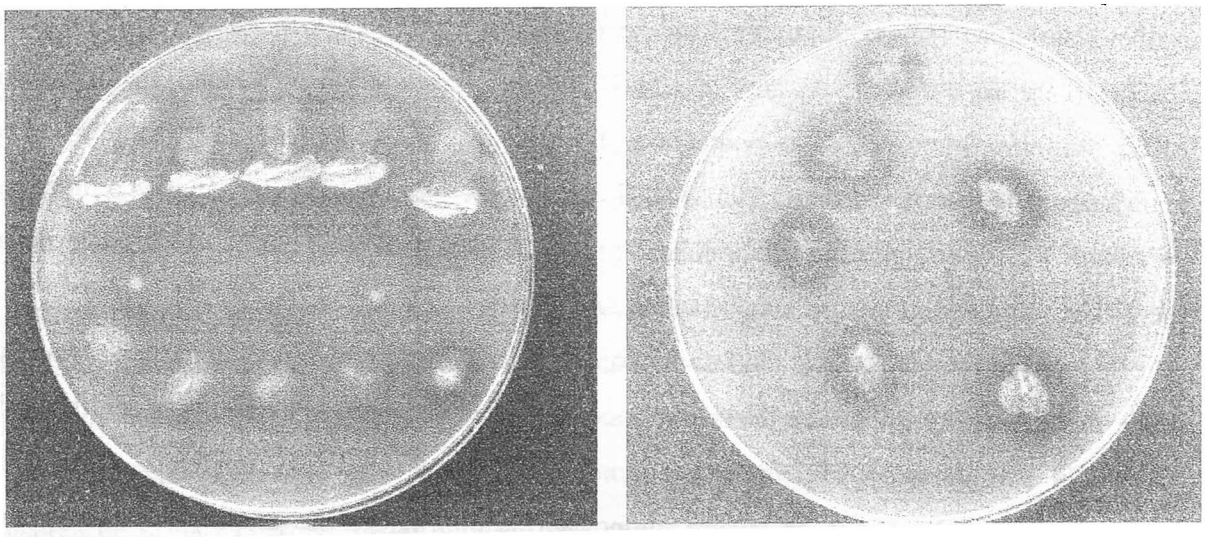


Fig. 33, A,B. Evidentierea unor factori de virulenta la tulpini de *V. cholerae* serogrup O1.

A. Evidentierea CAMP-like factorului, pe mediu cu sânge de oaie 5%, evidentiat prin insamântare in striuri, perpendiculare cu striuri ale tulpinii *S. aureus* ATCC 25923, β hemolitice, efectul actiunii lor sinergice fiind hemoliza completa.
B. Evidentierea hemolizinei Kanagawa, pe mediu agarizat Wagatsuma, cu adaos de 5% hematii de iepure, hemolizina prezenta la specia *V. parahaemolyticus,* dar recent semnalata si la tulpini de *V. cholerae* serogrup O1.

Alte genuri si specii de interes medical ale Fam. *Vibrionaceae :*

Aeromonas sp. – bacterie prezenta in apa, sol, alimente, materii fecale (om si animale); specia *A. hydrophila* – determina infectii ale plagilor, diaree, septicemii la pacienti imunocompromisi.

Pleisomonas shigelloides – bacterie prezenta in apa; poate fi agentul cauzal al gastroeenteritei si al unor infectii invazive la pacienti imunocompromisi.

Campylobacter sp. si *Helicobacter sp.*

Microorganismele identificate in prezent ca apartinând speciei ***Campylobacter jejuni*** au fost descoperite in 1931 de catre Jones si colab., ca agenti cauzali ai dizenteriei de iarna, la vite. In 1957 King a descris un grup de bacili microaerofili, mobili, incurbati, izolati din sângele copiilor cu dizenterie acuta, pe care i-a considerat ca fiind inruditi cu vibrionii (fiind foarte asemanatori cu *Vibro fetus*) si a afirmat ca acesti vibrioni trebuie sa fie foarte inruditi cu bacteriile descrise de Jones in 1931 si numite de catre acesta *Vibrio jejuni* si care ar putea fi cauza sindroamelor diareice de etiologie necunoscuta la copii. Aceasta afirmatie bazata pe intuitie, nu a fost demonstrata decât 15 ani mai târziu, in 1972 de catre Dekeyser si colab., care au izolat bacteriile inrudite cu vibrionii, din materiile fecale ale unor pacienti cu enterita acuta,

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

utilizând tehnica filtrarii care a permis bacililor mici, incurbati, sa traverseze membrana care retinuse bacteriile intestinale mari. Ulterior au fost si alte semnalari de cazuri de gastroenterita la om determinate de acesti vibrioni.

Istoria descoperirii speciei bacteriene *Helicobacter pylori* (numita inainte *Campylobacter pylori)* este si mai curioasa. Warren si Marshall sunt considerati descoperitorii acestei bacterii (in 1982 – Perth, Australia), totusi existau multe alte descrieri anterioare, datând inca de la sfârsitul secolului al XIX-lea, ale unor microorganisme spiralate evidentiate in probe bioptice prelevate din mucoasa gastrica umana. Numai dupa cultivarea cu succes a acestei specii bacteriene, utilizând atmosfera speciala pentru *Campylobacter*, i s-a acordat mai multa atentie, fiind considerata in prezent ca cea mai comuna cauza a infectiilor gastrointestinale umane, ca si a gastritelor.

Pentru stabilirea taxonomiei acestor bacterii (*Campylobacter* si *Helicobacter*), s-au folosit analize de imunotipizare si tehnici moleculare: hibridizarea ADN –ARNr, analiza secventiala a moleculelor de ARNr 16S.

Speciile de *Campylobacter* sunt microaerofile (necesita presiuni scazute de oxigen) si capnofile (necesita concentratii mari de dioxid de carbon); sunt bacterii spiralate, mobile cu ajutorul unui flagel polar. Aceste bacterii au un metabolism nefermentativ si neoxidativ, energia necesara rezultând din utilizarea aminoacizilor si a intermediarilor cu 4 si 6 atomi de carbon ai ciclului Krebs. Studiile de biologie moleculara , care au permis stabilirea gradului de omologie a moleculelor de ADN heterologe, au demonstrat ca aceste bacterii nu sunt inrudite cu vibrionii. Speciile de *Campylobacter* ocupa o mare varietate de nise ecologice; majoritatea speciilor colonizeaza animalele (bovine, porcine) si pot cauza sterilitate si avorturi. Specia cea mai comuna in laboratorul clinic este *Campylobacter jejuni.*

Helicobacter pylori

Mecanismele de patogenitate ale bacteriei *Helicobacter pilory* , responsabile de gastrite cronice si ulcere gastroduodenale, ca si de cancerul gastric, nu sunt pe deplin intelese, totusi se crede ca in virulenta acestei bacterii ar juca un rol important mai multi factori: mobilitatea, activitatea ureazica crescuta (rezulta amoniac, care neutralizeaza HCl, creând conditii favorabile aderentei bacteriilor la mucoasa stomacala), producerea de citotoxine, ca si aderenta la nivelul unor receptori specifici, evidentiati *in vitro* prin aderenta la diferite linii celulare.

S-a dovedit ca rolul flagelilor este mult mai complex in biologia celulelor bacteriene, prezenta lor la bacteriile patogene constituind un factor de virulenta, prin functia de stimulare a

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

adeziunii la diferite epitelii si prin capacitatea de a facilita patrunderea prin stratul de mucus ce acopera tesuturile epiteliale.

Rolul lor in virulenta este controversat, desi dupa anumiti autori, capacitatea bacteriilor patogene de a-si modifica pozitia in spatiu prin mobilitate activa este de importanta esentiala in virulenta. Rolul flagelilor in virulenta a fost studiat, in special, cu ajutorul mutantelor neflagelate sau al mutantelor "neinteligente" (celule flagelate cu defecte in sistemul de transductie a energiei sau flageli care se rotesc, dar prezinta anomalii de raspuns chemotactic). Mutantele neflagelate sau flagelate, dar nechemotactice de *Campylobacter jejuni,* colonizeaza mai greu suprafata epiteliilor decât cele mobile si chemotactice.

In tarile dezvoltate se constata in prezent un aparent declin al infectiilor cu acest agent patogen, datorita modului sau de transmitere de la persoana la persoana si evident, ruperii acestui lant prin masuri riguroase de igiena.

Diagnostic de laborator

- **bacteriologic** – evidentierea microscopica a bacteriilor in sucul gastric recoltat cu ajutorul sondei gastrice; cultivare in laborator pe medii speciale, in atmosfera de CO2 si identificare biochimica, utilizând trusa API Campy (cu incubare de 24 ore);

- **imunologic** – teste imunologice rapide pentru *screening*-ul populatiei cu ajutorul unor truse speciale de teren (*Auro – Dex – H. pilory, U.S.A.*), bazate pe principiul tehnicii ELISA – varianta calitativa, care evidentiaza anticorpi specifici in sângele pacientului.

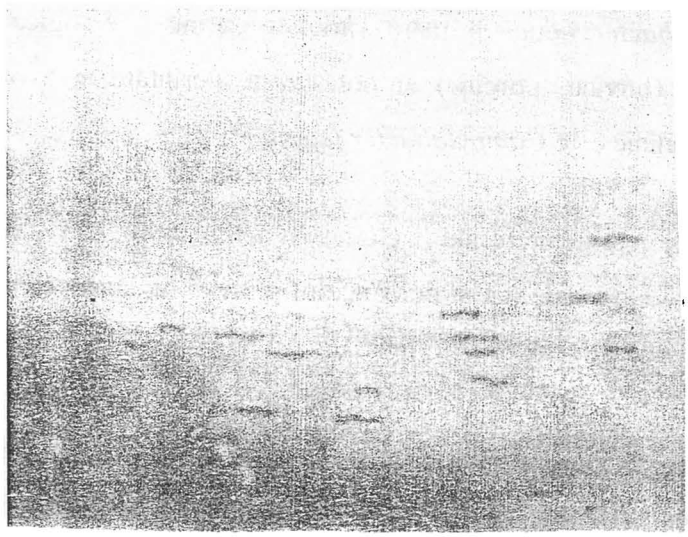


Fig. 34. *Helicobacter pylori.* Imaginea microscopica a bacteriilor de forma sinusoidala (~pasari) evidentiate intr-un frotiu din suc gastric (marire : x 1000).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

BACILI GRAM NEGATIVI AEROBI

G. *Pseudomonas*

Speciile incadrate in acest gen sunt bacili Gram negativi, drepti sau usor incurbati, nesporogeni, mobili, fiind dotati cu flageli polari monotrihi sau lofotrihi, strict aerobi, catalazo-pozitivi, oxidazo-pozitivi, glucozo-nefermentativi, care reduc nitratii la nitriti si chiar mai departe, pâna la azot molecular (in anaerobioza).

Sunt bacterii frecvente in mediul acvatic si sol (mai ales componente ale rizosferei), pe pietre, lemne, conducte, caracteristica fiind cresterea in microcolonii si biofilme, datorita aderarii lor la substrat prin intermediul glicocalixului, particularitate care le confera rezistenta la fagi, amoebe, substante antimicrobiene.

Specia reprezentativa: ***Pseudomonas aeruginosa*** are urmatoarele particularitati :

- specia cea mai frecventa, dintre aproximativ 250 specii ale genului;
- bacterie conditionat-patogena, dar care poate determina infectii grave, mai ales la indivizii cu deficit imunitar;
- specia este tipic pigmentogena (piocianina – *in vivo* si pioverdina – *in vitro*), desi exista si tulpini neproducatoare de pigment;
- creste la 42°C ;
- organism foarte adaptabil, cu necesitati nutritive foarte simple, ceea ce explica si caracterul ubicvitar: sol, ape, plante, intestinul uman si animal;
- bacteria este foarte sensibila la uscaciune, dar poate supravietui luni de zile la temperatura camerei;
- se dezvolta bine la interfata lichid-aer (mai ales in spitale, de exemplu in solutii dezinfectante, solutii perfuzabile, sapun hexaclorofenic) ; poate contamina si se poate dezvolta in lotiuni, produse cosmetice, fiind capabila sa se multiplice si in apa distilata, dar nu si in cea bi- si tridistilata ;
- modul de crestere in tesutul infectat este sub forma de microcolonii aderente, mucoide; prin cultivare *in vitro,* tulpinile izolate isi pierd caracterul mucoid.

Factori de virulenta. Capacitatea de adertenta ocupa locul principal la specia *Pseudomonas aeruginosa,* care este un exemplu tipic de bacterie cu multiple structuri adezive. In cazul speciei *Pseudomonas aeruginosa* s-a demonstrat ca tulpinile mobile care infecteaza arsurile sunt mai virulente decât cele imobile. Mai mult, varianta mobila a bacteriei ar fi mai virulenta, formând biofilme la nivelul tesutului pulmonar al bolnavilor cu fibroza chistica, dupa mecanismul descris pentru mediile naturale subacvatice: biofilm alcatuit din microcolonii bacteriene, acoperite de o matrice exopolizaharidica de la marginile careia se elibereaza celule foarte mobile care invadeaza tesutul sanatos.

Patogenie. *P. aeruginosa* este un patogen oportunist care produce complicatii majore la pacientii cu fibroza chistica, dar si o cauza semnificativa a morbiditatii la cei cu arsuri, cancer si

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

alte boli in care este prezenta imunodepresia. Desi multi produsi extracelulari ai bacteriei contribuie la virulenta sa, structurile filamentoase cunoscute ca pili tip IV, joaca un rol major favorizând aderenta bacteriilor la celulele epiteliale.

Virulenta acestui agent patogen nu se manifesta fata de orice gazda, ci in special fata de pacientii spitalizati care vin in contact cu persoane infectate, cu produse patologice (urina, exudat) sau cu diferite obiecte contaminate (vehiculi). Practic, poate fi contaminat cu celule de *Pseudomonas* aderente prin intermediul polizaharidelor capsulare, orice obiect care nu se sterilizeaza prin caldura, cum ar fi : aspiratoare si ventilatoare pentru respiratie asistata, umidificatoare de aer, aparate pentru aerosoli, incubatoare ale nou-nascutilor, obiecte de cauciuc si plastic (chiar daca acestea au suprafete ultrapolisate), pense, termometre, spalatoare de vase si de podea, robinete, plante ornamentale. La infectiile de origine exogena, se adauga si infectiile endogene, cu bacterii de pe tegumente sau din tractul intestinal.

Infectiile cronice ale tractului respirator cu tulpini de *P. aeruginosa* care produc mari cantitati de exopolizaharide mucoide (MEP) = alginati, constituie factorul patogen major al bolilor pulmonare cronice si al mortalitatii prin acestea, la pacientii cu fibroza chistica. Desi se cunoaste putin despre mecanismele care fac bacteria capabila sa initieze infectii la acesti pacienti, aceasta capacitate pare sa fie corelata cu dereglarile in biochimia si fiziologia mucusului respirator al pacientilor si exprimarea adezinelor pentru celulele epiteliale si mucine de catre bacterie. Tulpinile care initiaza infectia sunt fenotipic diferite de cele gasite in infectia cronica (detalii in Cap. Factori de virulenta – Capacitatea de aderenta). Anticorpii serici de la pacientii cu fibroza chistica, colonizati in mod cronic, au o capacitate semnificativ redusa de a media omorârea celulelor mucoide de *P. aeruginosa* crescute *in vitro* ca un biofilm pe suprafata unui substrat. Dupa unii autori, alginatul si alte antigene (LPS) ar determina o stimulare policlonala a limfocitelor B, care ar avea ca efect hipergamaglobulinemia din cursul fibrozei chistice. Insa severitatea acestei boli se coreleaza invers cu titrul anticopilor, paradox ce poate fi explicat prin faptul ca acesti anticorpi nu actioneaza ca opsonine cu rol stimulator al fagocitozei, dar contribuie la inflamatia mediata de complexe imune (reactie de hipersensibilitate tip III).

Succesul oricarui patogen depinde de capacitatea sa de a "simti" mediul de viata si ca raspuns, sa-si moduleze expresia acelor gene necesare pentru stabilirea in noua nisa. Capacitatea de a supravietui in diferite medii reliefeaza importanta intelegerii reglarii genelor care codifica factorii de virulenta, ca si identificarea semnalelor din mediu implicate. La bacteria *Pseudomonas aeruginosa* a fost recent descris un mecanism reglator al exprimarii genelor, cunoscut ca *autoinductie* sau *quorum sensing*. S-a dovedit ca mecanismul este utilizat si de alti

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

agenti fito- si zoopatogeni, fiind aproape ubicvitar la bacteriile Gram negative. Acest sistem permite unei populatii bacteriene sa-si monitorizeze densitatea, cu scopul de a permite initierea unor procese dependente de densitate. Acest mecanism de *quorum sensing* poate actiona si pentru a asigura la un moment dat producerea unor factori meniti sa contracareze efectorii imunitari ai gazdei. Probabil ca daca *P. aeruginosa* ar fi in organismul gazda la o densitate celulara mica si ar initia sinteza factorilor de virulenta, acestia ar declansa raspunsul imun al gazdei si date fiind densitatea celulara mica si, proportional, concentratia mica a produsilor de virulenta, infectia ar fi usor eliminata. Din contra, daca producerea factorilor care declanseaza raspunsul imun este initiata când densitatea celulara este mare, infectia poate avea mai multe sanse de a evolua. Gradul mare de corelatie intre autoinductie si densitatea celulara, dependenta de timp, a condus la adoptarea unei noi terminologii si inlocuirea termenului de autoinductie cu *quorum sensing* .

O alta specie semnificativa pentru patologia umana este *Burkholderia cepacia* (denumirea actuala a speciei *Pseudomonas cepacia)*, un agent fitopatogen, dar care determina si la om infectii oportuniste la pacientii imunocompromisi (pneumonii, infectii urinare, endocardite, peritonite, otite, infectii asociate cateterelor). Are o rezistenta deosebita la agentii antiseptici si dezinfectanti. Este una din cele doua specii de bacili nefermentativi care este lizin-decarboxilazo-pozitiva.

Diagnosticul de laborator

- izolare selectiva pe mediu pentru *Pseudomonas sp.* (cetrimid-agar), examinarea microscopica a preparatelor proaspete L/I pentru evidentierea mobilitatii si a frotiurilor colorate Gram: evidentiere de bacili Gram negativi, izolati, drepti sau usor incurbati, cu capete usor efilate;
- pigmentogeneza: piocianina si pioverdina (pe medii speciale – vezi Anexa IX) ;
- testarea proprietatilor biochimice (testul catalazei, oxidazei, al reducerii nitratilor) ; teste conventionale sau sisteme microtest (API 20 E – pentru Bacili Gram negativi enterici sau API 20 NE – pentru Bacili Gram negativi non-enterici) care permit identificarea agentului patogen in 24 ore.

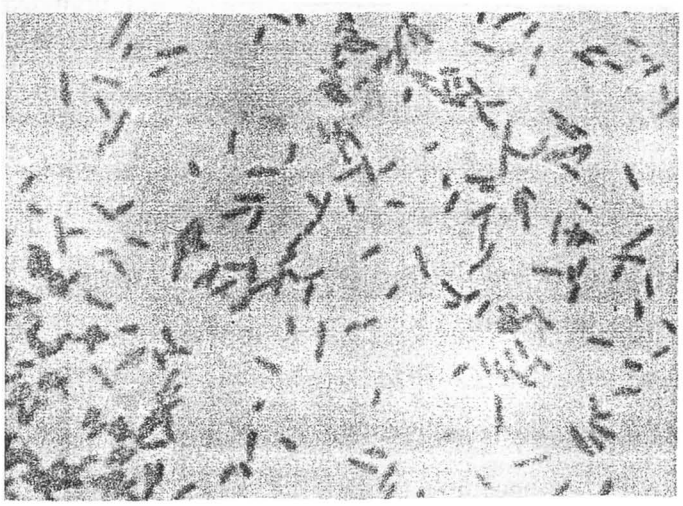


Fig. 35. *Pseudomonas aeruginosa.* Aspect tipic al acestor bacili, mai fini si cu capete efilate, pe un preparat colorat Gram (Marire: x 1000).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

BACTERII ANAEROBE (GRAM POZITIVE SI GRAM NEGATIVE, BACILI SI COCI)

Bacteriile (microorganismele in general) de importanta medicala sunt impartite in trei mari categorii in functie de tipul de metabolism energetic, al reactiilor prin care isi procura energia necesara cresterii si diferitelor activitati metabolice (mai exact in functie de natura acceptorului final de electroni): **bacterii cu respiratie aeroba** (acceptorul final de electroni - oxigenul molecular), **bacterii cu respiratie anaeroba** (acceptorul final de electroni – alti compusi, diferiti de O_2) si **bacterii cu metabolism energetic fermentativ** (proces in care reactiile chimice producatoare de energie necesita prezenta unor compusi organici ca acceptori finali de electroni). In esenta, nevoia de O_2 reflecta mecanismul molecular prin care microorganismele isi satisfac nevoile energetice.

Pentru necesitati de ordin practic, pe baza efectului direct pe care oxigenul il are asupra cresterii si metabolismului, microorganismele se grupeaza in patru categorii:

1) **Microorganisme strict sau obligat aerobe-** necesita oxigen molecular ca acceptor final de electroni; nu cresc in absenta O_2. Metabolismul lor energetic este de tip oxidativ. Calea metabolica fermentativa nu este folosita pentru ca nu poate genera cantitatea de energie necesara sintezei compusilor celulari din categoria acizilor grasi prezenti in structura acestor bacterii. Exemple de bacterii strict aerobe: *Bacillus anthracis, B. cereus, Mycobacterium tuberculosis* etc.
2) **Microorganisme strict sau obligat anaerobe** – nu se pot dezvolta in prezenta O_2 si care pot fi cultivate numai in medii saracite in O_2 , deoarece chiar la presiuni joase acesta poate avea efect inhibitor; in practica se folosesc diferite metode pentru asigurarea anaerobiozei. In aceasta categorie intra exclusiv bacterii. Oxigenul este toxic pentru bacteriile anaerobe (mecanismul nu este elucidat, dar se presupune ca sunt generati produsi de reducere ai oxigenului, cum ar fi peroxidul de hidrogen (H_2O_2), ionul superoxid (O_2^-), ionul oxidril (HO^-), oxigenul singlet ($^1O_2$); la bacteriile moderat anaerobe (care tolereaza o cantitate mica de O_2 in mediul de crestere – 2 - 5%) exista nivele scazute de enzime protectoare (catalaza, superoxiddismutaza = SOD); fata de ionul oxidril (HO^-) si oxigenul singlet ($^1O_2$) nu exista mecanisme enzimatice de contracarare.

   Exemple de bacterii strict anaerobe: *Clostridium tetani, C. botulinum, C. perfringens* etc.
3) **Microorganisme aerobe, facultativ anaerobe** - isi pot obtine energia necesara cresterii, pe cale oxidativa, folosind O_2 ca acceptor final de electroni, dar aceste microorganisme pot creste si in absenta O_2 , obtinând energia necesara pe cale fermentativa; unele desfasoara un metabolism de tip fermentativ (bacterii lactice), chiar in prezenta aerului, fara a fi sensibile

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

la O_2 ; altele, cum ar fi levurile, *E.coli* si intreg grupul enterobacteriilor, *Staphylococcus sp., Streptococcus sp., Vibrio sp.*, sunt capabile sa-si orienteze metabolismul spre respiratie sau fermentatie, in functie de conditiile de mediu (de presiunea relativa a O_2).

4) **Microorganisme microaerofile** – cresc cel mai bine la presiuni de O_2 mai mici (~ 0,2 atm) decât in aerul atmosferic. Aceasta particularitate reflecta prezenta unor enzime care sunt inactivate in conditii de oxigenare puternica si pot fi mentinute in stare functionala numai la presiuni joase de O_2 . Ex: *Spirochetales, Campylobacter, Helicobacter* etc.

Un numar de aprox. 300 de specii de bacterii anaerobe sunt prezente in cavitatea bucala, iar in alte cavitati au fost izolate si identificate aprox. 500 de specii.

In 1861 Pasteur descoperea agentul de fermentare al acidului butiric – *Clostridium butiricum*, pornind de la observatia ca in mijlocul lamelei germenii aveau miscari rapide, pe când la marginile lamelei miscarile erau foarte lente pentru ca la acest nivel patrundea aerul. De asemenea, a constatat ca daca intr-o cultura in plina dezvoltare, care produce si o mare cantitate de gaze, introducea aer, fermentatia se oprea. A emis ipoteza potrivit careia fermentul butiric ar fi fost un infuzor prezent in medii fara oxigen liber, acesta fiind preluat din diferiti compusi.

In 1877 Pasteur a descoperit agentul patogen *Clostridium septicum*. La inceputul secolului XX, s-au descoperit in serie alti agenti patogeni anaerobi. Acestia au fost clasificati in **anaerobi telurici**, sporogeni, apartinând genului *Clostridium* si **anaerobi endogeni**, componenti ai microbiotei normale a organismului uman si animal. In ultimele decenii ale secolului XX s-a inregistrat o adevatata explozie a informatiilor despre anaerobi, mai ales datorita imbunatatirii tehnicilor de lucru si de mentinere a conditiei de anaerobioza, dar si datorita faptului ca medicina moderna favorizeaza indirect aparitia infectiilor cu anaerobi oportunisti, prin actul chirurgical pe abdomen in special, dar si ca urmare a antibioteratiei cu streptomicina sau gentamicina, antibiotice care inhiba germenii aerobi, nu si pe cei anaerobi, sau a imunosupresiei organismului consecutiva corticoterapiei. Dupa introducerea in protocolul terapeutic a metronidazolui , care inhiba eficient anaerobii, administrat preoperator cu scopul profilaxiei infectiilor postoperatorii cu anaerobi, in anii '70 s-a descoperit ca acest antibiotic in cantitati mari are actiune cancerigena la animalele de laborator.

Habitat. Habitatul bacteriilor anaerobe cu potential patogen este diferit, in functie de capacitatea lor de sporogeneza si implicit, de rezistenta la conditiile mediului extern:

Anaerobii sporulati- sunt membri predominanti ai microbiotei telurice, prezenti in sol, unde supravietuiesc sub forma de spori. S-a cercetat prezenta si viabilitatea sporilor in soluri nelucrate de sute de ani si la adancimea de 1-2 m s-au gasit spori viabili, ceea ce demonstreaza ca solul mentine

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

viabilitatea lor perioade indelungate. Bacteriile patogene sporulate se gasesc si in tractul digestiv al animalelor si omului, unde ajung odata cu alimentele de origine vegetala. Tubul digestiv ofera un mediu prielnic cresterii si multiplicarii celulelor de *Clostridium*. Din intestin, acestea sunt eliminate cu materiile fecale si ajung in sol. *Circuitul entero-teluric* este o adaptare care permite anaerobilor telurici sa se multiplice in tubul digestiv si sa se conserve in sol, datorita capacitatii de sporulare. Intreruperea acestui ciclu si declansarea unei infectii se produce cu o frecventa scazuta.

In aceasta categorie este inclus G. *Clostridium*, cu peste 120 de specii sporogene de bacili anaerobi Gram pozitivi , cu semnificatie clinica:

In cadrul genului *Clostridium,* patru specii sunt aerotolerante si pot fi dificil de diferentiat de alti bacili aerobi. Clostridiile aerotolerante nu formeaza spori in conditii aerobe si produc colonii mai mari in conditii anaerobe. Clostridiile capabile sa creasca pe medii imbogatite in aer sunt: *C. tertium, C. histolyticum, C. carnis, C. durum*. Clostridiile aerotolerante pot fi confundate cu alti bacili, aerobi facultativ anaerobi, mai ales cu lactobacilii pentru ca, asemenea acestora, sunt catalazo-negative si nu formeaza spori când cresc in conditii aerobe.

Sunt dificil de detectat spori la unele specii de clostridii, cum ar fi *C. ramosum, C. clostridioforme* si alte specii. Totusi majoritatea tulpinilor acestor specii sunt rezistente la incalzire si tratarea cu alcool care omoara celulele vegetative, dar nu si sporii. Chiar daca *C. clostreidioforme* si alte specii se coloreaza ca bacili Gram negativi, totusi sunt sensibili la vancomicina, care confirma caracterul lor Gram pozitiv.

Anaerobii nesporulati sunt dublu conditionat patogeni, pentru declansarea unei infectii fiind necesare conditiile de anaerobioza si imunodepresie. Aceste bacterii se gasesc numai in organismul animal si al omului, facând parte din microbiota endogena rezidenta, stabila a organismului, prezenta pe piele, mucoasa bucala, tractul digestiv, mucoasa uretrala si vaginala. Se pot localiza in toate regiunile corpului. Anaerobii nesporulati apartin urmatoarelor genuri mai importante:

- G. *Actinomyces*
- G. *Bifidobacterium*
- G. *Eubacterium*
- G. *Lactobacillus*
- G. *Propionibacterium*

Daca anumite specii de *Clostridium* sunt producatoare de toxine, infectii si boli grave, bacilii nesporogeni sunt prezenti in mod normal in infectii cronice. Desi aceste specii sunt clasificate ca anaerobe, majoritatea speciilor de *Actinomyces* si multi lactobacili sunt facultativ anaerobi cu crestere lenta.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Membrii microbiotei normale sunt patogeni oportunisti, manifestându-si potentialul patogen mai ales dupa antibioterapie, putând genera infectii, cum ar fi apendicita si peritonita, colecistita, bacteriemie, iar transportul lor in organism poate conduce la infectii cu diferite localizari. In infectiile cu anaerobi nesporulati diagnosticul bacteriologic este necesar, boala fiind dificil de reprodus experimental. Sunt insensibili la penicilina, astfel ca in cazurile de infectii cu anaerobi nesporulati este necesara antibiograma. Daca este o infectie mixta, medicatia este greu de stabilit, necesiând un antibiotic pentru anaerobi si unul pentru aerobi, sau un antibiotic cu actiune universala, cum este de exemplu cloramfenicolul. Acest antibiotic este insa foarte toxic, adminisatrat in cantitate mare si o perioada lunga de timp, având efecte secundare severe: altereaza mitocondriile, inhiba sinteza imunoglobulinelor, inhiba eritropoeza si in cele din urma determina aplazie medulara ireversibila. Un derivat al cloramfenicolului, tiamfenicolul este eficient si utilizarea sa nu este insotita de aceste efecte toxice.

Patogenitate.

Bacteriile anaerobe sporulate sunt conditionat patogene, necesitând conditii de anaerobioza pentru a initia un proces infectios. Bolile determinate de bacteriile anaerobe exogene includ: botulismul alimentar, de ranire si infantil (agentul patogen fiind *Clostridium botulinum*), gastroenterita necrozanta, tetanos, gangrena gazoasa (mionecroza), infectii ale ranilor prin muscatura, contaminare cu sol, septicemii *post abortum*.

Genul ***Clostridium*** cuprinde aproximativ 120 de specii de bacili telurici, mobili, cu flageli peritrichi, Gram pozitivi (devin Gram negativi in culturi mai vechi de 18 h), sporogeni cu spori deformanti, conditionat patogeni, producatori de exotoxine. Tolereaza expunerea la O_2 fara ca celulele sa moara, pentru ca au enzime inactivatoare. Nu realizeaza reducerea dezasimilatoare a ionilor SO_4^{2-}. Sunt prezenti in sol, dar majoritatea exista si in microbiota normala (cu exceptia speciei *C. botulinum*).

C. botulinum - agentul patogen al botulismului (foarte rar intâlnit, deoarece apar conditionari pentru producerea sa), determinat de toxina botulinica, preformata in alimente. Cea mai puternica toxina biologica, care determina o inhibare a sinapselor excitatorii ale placii motorii si paralizie flasca. Botulismul de ranire si infantil a demonstrat ca aceste bacterii se pot multiplica si in tesuturile vii. Bacteriile sunt prezente in sol si in materiile fecale, desi nu sunt componenti ai microbiotei intestinale, provenind din spori ingerati odata cu alimentele.

C. tetani - bacterie Gram pozitiva, cu aspect de bat de chibrit (racheta de tenis) datorita sporului terminal deformant (fig. 36). Este o bacterie mobila, pe suprafata mediului solid

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

deplasându-se ca si *Proteus*. La izolare este anaeroba, dar prin pasaje succesive devine aeroba si nu mai produce toxina. Prezent in sol, ajunge odata cu furajele in tubul digestiv si se multiplica in rumenul bovinelor. Imbolnavirile au o frecventa mare, la persoanele care prezinta leziuni care vin in contact cu sol amestecat cu balegar; la locul leziunii bacteriile se multiplica.

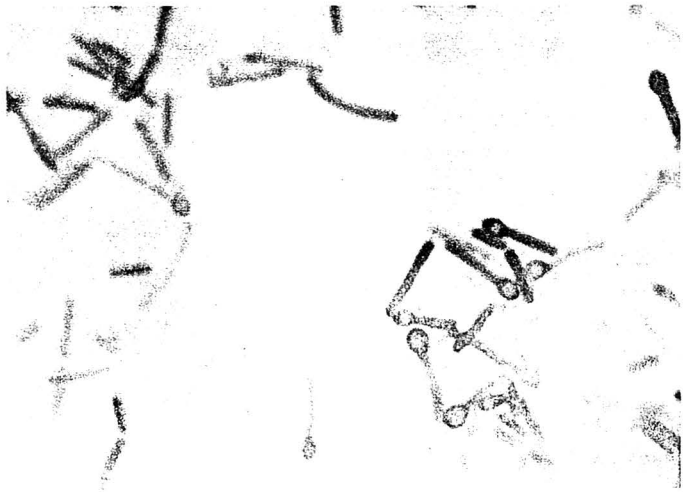


Fig. 36. *Clostridium tetani.* Imagine microscopica a unui frotiu colorat Gram, efectuat din produs patologic recoltat dintr-o plaga infectata a piciorului; se observa bacili tetanici sporulati, sporii terminali deformanti (necolorati) determinând aspectul tipic al acestor bacili, de „bat de chibrit" (marire: x 1000).

Toxina tetanica a fost prima exotoxina tratata cu formol si transformata in anatoxina (Ramon, 1930). *In vivo*, toxina determina o excitare a componentei postsinaptice a motoneuronilor spinali si starea de tetanos sau paralizie spastica. In România exista o incidenta de 20 – 30 cazuri de tetanos /an datorita ineficientei vaccinului. Dupa tetanos, nu se produce imunizarea, pentru ca toxina produsa *in vivo* este in concentratie mica. Serul imun antitoxina este eficient daca este administrat inainte ca toxina sa se lege de receptorii din sistemul nervos central.

Clostridii histotoxice - determina infectii (exogene) ale ranilor si infectii de origine endogena, cu bacterii provenite din microbiota rezidenta, ajunsa la nivelul tesutului lezat, pe calea fluxului sanguin. Infectiile ranilor sunt simple contaminari - când germenul nu depaseste poarta de intrare, dar pot evolua si spre infectii propriu-zise: de exemplu, *celulita* sau necroza tesuturilor de multiplicare sau *mionecroza*, in care germenii se extind in teritorii musculare largi, neavariate de traume. Clostridiile histotoxice produc enzime de soc; ex.: ***C. perfringens***, *C. novyi (C. oedematiens), C. septicum, C. histolyticum, C. bifermentans*. Uneori sunt asociati mai multi germeni, cu necroza musculara, producere de gaz, toxemie. Cea mai mare frecventa o are *C. perfringens*, care se prezinta sub forma de bacili Gram pozitivi, izolati, scurti si grosi, cu capete rotunjite (fig. 37) care

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

nu sporuleaza decât *in vitro*, fermenteaza zaharurile cu producere de gaze. Exista in sol, ape uzate, aer, pe obiecte, dar si pe suprafata corpului si in intestin (10^4 - 10^{10} celule/g continut colonic), fiind un agent conditionat-patogen. Produce numeroase toxine solubile si enzime: fosfolipaza = lecitinaza, colagenaza, hemolizina, proteaze (hidrolizeaza gelatina), dezoxiribonucleaze. Inocularea intramusculara experimentala produce topirea tesuturilor. Tulpinile de *C. perfringens* se clasifica in 5 toxinotipuri (A, B, C, D si E), clasificare bazata pe producerea a 4 toxine majore (α, β, ε si θ), fiecare dintre ele inducând un sindrom specific. Identificarea corecta a acestora este necesara pentru studiile epidemiologice si pentru dezvoltarea unor masuri protectoare eficiente, incluzând si vaccinarea. Aceste toxine sunt secretate in mediu in timpul fazei exponentiale de crestere. *C. perfringens* tipul A este ubicvitar si cel mai comun toxinotip in mediu, ca si agentul cauzal al gangrenei gazoase la om, determinata in principal de toxina α si secundar de toxina θ si enzime hidrolitice. Tipul A este asociat si cu intoxicatia alimentara la om.

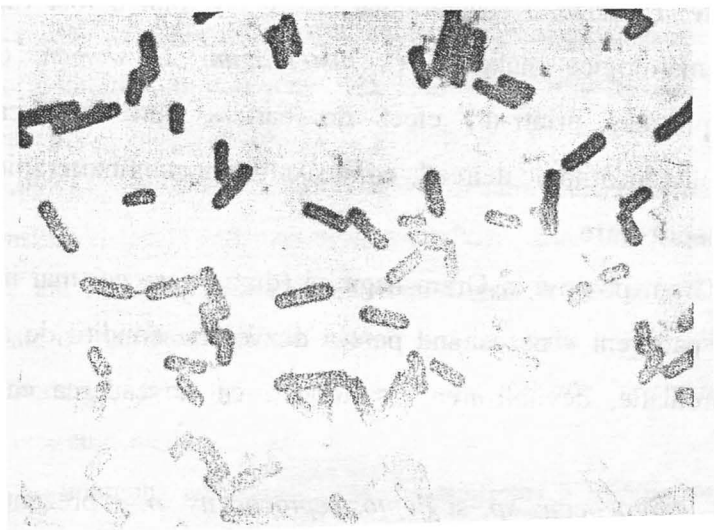


Fig. 37. *Clostridium perfringens*. Imagine microscopica a unui frotiu colorat Gram, efectuat dintr-o cultura pura, in care se observa bacili Gram pozitivi, izolati, scurti si grosi, cu capete rotunjite, nesporulati (marire : x 1000).

Specia *C. perfringens* nu este invaziva; produce si toxiinfectii alimentare, consecutive de exemplu schimbarii dietei, care au insa o frecventa mai mica comparativ cu cele determinate de *Salmonella sp.* si o evolutie rapida, benigna. Celulele se multiplica in alimente. Enterotoxina nu este preformata, pentru ca se formeaza in momentul sporularii. Toxina determina accentuarea motilitatii digestive, diaree, inversarea transportului apei, Na, Cl (nu este implicat mecanismul adenilatciclazei). Toxinele pot fi si cauza enteritei necrozante. Enterotoxemia se datoreaza multiplicarii rapide a germenului intestinal.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

C. perfringens este factorul cheie in etiologia enterocolitei necrozante, datorata fie germenilor microbiotei intestinale, fie celor exogeni (de ex, din carnea de porc). Se produce paralizia muschilor netezi intestinali si necroza in jejun. Factori favorizanti: excesul de alimente, ischemie locala, subnutritia care este cauza scaderii secretiei de enzime pancreatice care scindeaza toxina, prezenta unor inhibitori ai tripsinei, aceasta enzima fiind activa la pH acid (de ex. –in cazul unui consum de legume in exces, pH-ul sucului gastric devine alcalin).

C. perfringens este si principalul anaerob acceptat ca un indicator bacteriologic al poluarii fecaloide a apei.

C. septicum determina infectii frecvent asociate cu carcinomul colorectal, cu o rata mare a mortalitatii. Poate fi izolat din sânge sau plagi infectate. Prezenta sa in culturi este adesea primul semn ca un carcinom poate fi prezent. Izolarea clostridiilor din sânge in absenta semnelor clinice de boala, poate fi un eveniment trecator si necorelat neaparat cu boala, cu exceptia speciei *C. septicum.*

Clostridii aerotolerante: *C. tertium* (bacteriemia cu *C. tertium* a fost raportata la pacienti cu neutropenie si boli hematologice maligne*), C. histolyticum, C. durum, C. difficile* (o specie endogena, normal supresata, printr-un efect de bariera permisiva, care determina colita pseudomembranoasa, colita insotita de diaree la copii si adulti postantibioterapie.

Bacteriile anaerobe nesporulate

-coci si bacili, Gram pozitivi si Gram negativi (dintre care cei mai importanti sunt bacilii); sunt dublu conditionat patogeni – necesitând pentru dezvoltare conditii de anaerobioza in tesuturi (prin modificari de circulatie, devitalizarea tesuturilor), ca si scaderea capacitatii de aparare a organismului-gazda.

Coci Gram pozitivi – *Peptococcus sp.* si *Peptostreptococcus sp.* – prezenti pe piele, in cavitatea bucala, caile genito-urinare; determina hidrosadenite, chisturi dermoide, ulcere ischemice la persoane imunodeprimate. Infectii mixte, cu efect necrozant al tesuturilor *Peptococcus- Bacteroid*es.

Coci Gram negativi – prezenti in cavitatea bucala, caile respiratorii superioare si genitale. Ex. G. *Veionella* , asemanator cu *Neisseria sp.*.

Bacili Gram pozitivi – fac parte din microbiota normala in majoritate; in cavitatea bucala au densitatea de 10^7-10^9 celule/ml saliva; 10^{10}-10^{12} celule /g continut colonic. Sunt prezenti si in caile respiratorii superioare, caile genito-urinare, intestin. Determina leziuni necrozante, febra puerperala, colite ulcerante, abcese, septicemii. Frecvent se asociaza mai multi germeni in procesul infectios (de ex. in perforatiile apendicelui). Nu toate speciile au potential patogen.

Specii patogene:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

-*Actinomyces sp.: A.. odontolyticus, Actinobacillus actinomycetemcomitans* sunt specii implicate in boala periodontala; alte specii produc actinomicoze cervico-faciale, pulmonare, abdominale, abcese cerebrale, hepatice, pulmonare, endocardite, periodontite, infectii datorate intepaturilor de insecte.

Speciile de *Actinomyces* sunt anaerobe si comensale ale cavitatilor naturale la om si animale (mamifere); niciodata izolate din sol, aceste specii pot fi conditionat-patogene, fiind agentii actinomicozei cervicofaciale la om si animale. Aceasta localizare cervicofaciala si cerebrala este predominanta (50% din cazuri), urmata de localizarea abdominala (apendice perforat, ulcer perforat), toracala (pleurezie) si alte localizari mai putin frecvente. Infectiile provocate sunt putin contagioase, in mod asemanator cu cele provocate de alte bacterii strict anaerobe. Dezvoltarea bacteriilor si infectia consecutiva este favorizata de:

- contuzii ale tesuturilor, cum sunt cele provocate de extractiile dentare si fracturi ale maxilarului;
- staza la nivelul canalelor excretoare, provocata de ex. de litiaza renala;
- prezenta altor germeni anaerobi (de ex. fuzobacterii si spirochete);
- corticoterapie, care determina un efect de imunosupresie.

Infectia se poate extinde in tesuturile si organele vecine prin contiguitate, ca si pe cale sanguina (nu si pe cale limfatica). O reactie de scleroza a tesuturilor invecinate limiteaza propagarea infectiei, dar favorizeaza supravietuirea germenilor datorita mediului anaerob creat si limitarii patrunderii antibioticelor. Procesul de necroza aparut in interiorul unei leziuni deja sclerozate, conduce la formarea unui abces si explica recidivele, necesitatea unor tratamente prelungite cu antibiotice si, de multe ori, a unei interventii chirurgicale.

Actinomyces israëli (A. bovis) este o specie de bacili ramificati, prezenti pe dintii cariati, ca si in criptele amigdaliene, constituind focare inflamatorii cronice. Poate determina leziuni subcutanate ale regiunii cervico-faciale si fistule ale acestora, prin care se elimina granule galbui sau albicioase (asemanatoare incluziilor de sulf, formate din germeni inglobati intr-un depozit lipidic provenit din tesuturile gazdei). Alte localizari: repiratorie, digestiva, genitala, rinichi, ficat, oase, glande lacrimale, sistem nervos central. Tratamentul etiologic se face cu penicilina.

Eubacterium sp. – impreuna cu *Actinomyces sp.* determina o infectie mixta, numita *a*ctinomicoza pelvica, favorizata de utilizarea dispozitivelor contraceptive intrauterine;

Bifidobacterium denticum – izolat din infectii pulmonare;

Propionibacterium acnes component al microbiotei tegumentelor, dar si a tractului intestinal, respirator superior (mai ales a narilor), urogenital. Datorita prezentei lor pe piele, propionibacteriile sunt adesea contaminanti ai probelor de sânge sau a altor fluide ale corpului recoltate prin punctionarea pielii. Izolarea repetata din probe de sânge sugereaza ca bacteria poate avea semnificatie clinica. Tulpini ale acestei specii au fost implicate in infectii ale ulcerelor corneene, valvulelor cardiace si dispozitivelor protetice (articulatii artificiale) si sunturilor ventriculare. Aceste infectii pot conduce la osteomielita, bacteriemie, endocardita si meningita –anumite tulpini, care determina acnee, produc lipaza, care determina eliberarea acizilor grasi din trigliceridele sebumului, care sunt iritanti si comedogeni. Produce si alte enzime: hialuronidaza, condroitin-sulfataza, neuraminidaza. Catalazo-pozitiv si indol-pozitiv (teste utile identificarii

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

prezumtive.), speciile de *Propionibacterium* sunt adesea numite "difteromorfi anaerobi" pentru ca bacilii sunt neregulati, pleomorfi si adesea grupati in "cluburi".

P. propionicum – agentul cauzal major al actinomicozei.

Bacili Gram negativi

- *Bacteroides sp.- B. fragilis, B. distasonis, B. tetaiotaomicron, B. asaccharolyticus*; cresc in medii cu 3% O2, isi mentin viabilitatea chiar 20 min in aer (aerotolerante); determina peritonite, pot trece in sânge. Poseda catalaza si SOD care fac posibila diseminarea germenului pe cale sanguina. Suporta concentratia de oxigen tisular. Au material capsular, lipaze, β-lactamaza, proteaze. Uneori in infectii apare in stare pura, dar frecvent este izolat din infectii mixte. Determina frecvent infectii la pacientii cu SIDA.
  - *Bacteroides sp.* - speciile nepatogene din microbiota normala desfasoara procese fermentative (nu sunt celulozolitice, dar se dezvolta pe seama acestora);
- *Fusobacterium sp. – F. nucleatum* – microbiota orala- specie conditionat-patogena;
  - *F. necrophorum* – microbiota normala a intestinului gros; specie prezenta pe mucoasa bucala, in placa dentara; determina infectii pleuropulmonare; se asociaza cu *B. fragilis;* infectioasa si la animale (necrobaciloza hepatica).
- *Porphyromonas gingivalis* si *Prevotella melaninogenica.* (pigmentogene, asociate cu *Bacteroides sp.);* specii implicate in boala periodontala;
- *Leptotrichia buccalis* = bacilul fusiform al lui Vincent – bacterii Gram negative strict anaerobe nesporogene.

Diagnosticul de laborator

-bacteriologic - *metode de cultivare in anaerobioza*: fizice, chimice, biologice, combinate; mai utilizate sunt:

- **metoda clasica a plicului cu pirogalol**: 0,4 g pirogalol, 0,4 g Na2 CO3, 4g talc, intr-un plic de hârtie de filtru, fixat pe capacul placii, deasupra caruia se aseaza placa insamântata, care se fixeaza cu parafina topita;
- **metoda Gas Pak** – recipient ermetic inchis + plicuri speciale (tip *BBL Gas Pak*) cu anumite substante si un catalizator de paladiu; la adaugarea de apa in momentul folosirii, substantele reactioneaza si genereaza H_2 si CO_2; indicator al potentialului redox al mediului- benzi de hârtie de filtru imbibate cu albastru de metilen; in mediu reducator, hârtia trebuie sa fie albastra;

- incubatoare cu CO_2.

- examenul caracterelor de cultura (de ex. *C. septicum* formeaza pe geloza-sânge colonii cu aspect tipic –„cap de meduza"- fig. 38) si microscopic pe preparate colorate Gram (*C. clostridioforme* si alte specii se coloreaza ca si Gram negativii; sensibilitatea la vancomicina este un test de

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

confirmare a caracterului Gram pozitiv), ca si pentru evidentierea sporilor (metoda *Benito-Trujillo* cu verde malachit);

- **teste biochimice**, de ex.: **bacilii Gram pozitivi nesporogeni**, din microbiota normala, care au un potential patogen scazut, fiind rar izolati in cultura pura (frecvent dau infectii mixte), pot fi diferentiati pe baza produsilor metabolici rezultati prin cultivarea lor pe medii speciale:
  - *Propionibacterium sp* produce acid propionic si acetic+/- lactic;
  - *Bifidobacterium sp.* produce acid acetic si lactic (acid acetic in cantitate mai mare);
  - *Lactobacillus sp.* produce acid lactic- produs final major;
  - *Actinomyces sp.* – produsul major este acidul succinic+/- acid acetic sau lactic;
- identificare cu **sistemul microtest tip *API 20 A*** (pentru anaerobi sporulati si nesporulati) sau API Coryne (pentru *Actinomyces sp., Propionibacterium sp.*)
- teste utile identificarii speciei *C. perfringens* (bacil scurt, gros, capsulat);
  - **testul hemolizei** si **evidentierea CAMP-factorului** (fig. 39); pe geloza-sânge;
  - **testul lecitinazei** (opacifierea mediului in jurul coloniilor), **reactia de semineutralizare a toxinei prin testul Nagler** (fig. 40) si **producerea cheagului alveolar in lapte turnesolat**, sunt teste pozitive, importanta – specie care determina infectii cu mortalitate mare, chiar sub tratament cu antibiotice (50 – 70%).

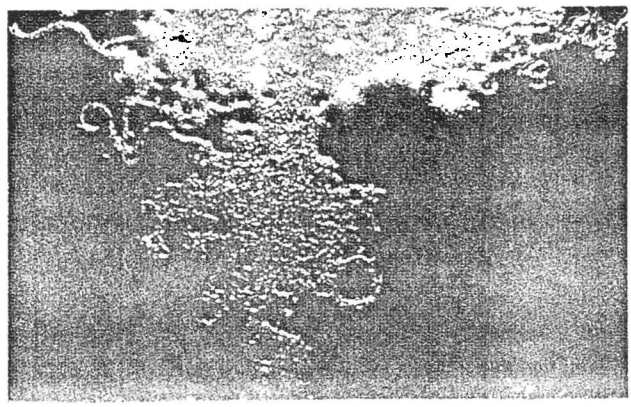


Fig. 38. *Clostridium septicum* pe geloza-sânge dupa 8 ore de incubare: colonii "cap de meduza"

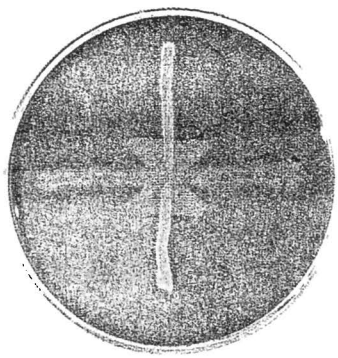


Fig. 39. Testul CAMP - de evidentiere a efectului sinergic, demonstrat de aparitia unei zone de hemoliza completa in forma de sageata, produsa la incrucisarea culturilor in striuri perpendiculare a unor tulpini de *Clostridium perfringens* si *Streptococcus agalactiae.*

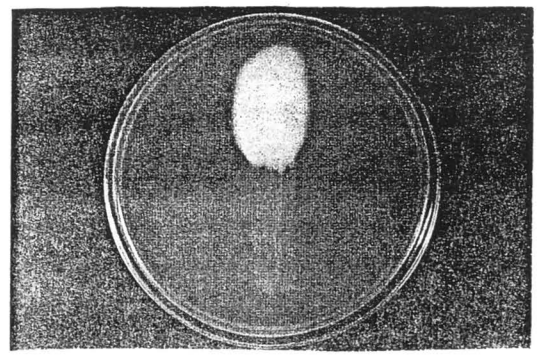


Fig. 40. Testul Nagler – reactia de semineutralizare a lecitinazei (pe mediu cu galbenus de ou) data de *C. perfringens* (insamântat in striu median), in prezenta unui ser imun anti-toxina incorporat in mediu si care (in partea de jos a placii) impiedica reactia obisnuita de opacifiere a mediului, datorata precipitarii acizilor grasi rezultati din degradarea lecitinei (sus).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

BACILI ACIDOALCOOLOREZISTENTI

Mycobacterium tuberculosis

Bacteria *Mycobacterium tuberculosis* a fost izolata in 1881, de catre R. Koch, fiind cunoscuta si sub numele de „bacilul Koch" (B.K.). Tuberculoza era cunoscuta insa dinainte; sapaturile arheologice au scos la iveala probe care demonstreaza prezenta acestei boli in patologia umana chiar in urma cu 6000 de ani. Boala afecteaza nu numai specia umana, ci si specii animale; timp de multi ani, pâna la descoperirea substantelor chemoterapeutice si antibiotice tuberculicide (hidrazida acidului izonicotinic -HIN, rifampicina) a fost considerata o boala fara remedii. In cursul bolii, se produc noduli pulmonari, vizibili prin RX ca ~tuberculi, de unde denumirea de tuberculoza. Agentul patogen poate disemina in organism (oase, ficat, rinichi, organe genitale) – complicatie numita tuberculoza miliara (lat. *milium* = samânta). Tuberculoza este o boala consumptiva (agentul patogen distruge tesutul afectat), care in prezent este considerata o boala vindecabila, daca beneficiaza de un tratament corespunzator (medicamentos si igieno-dietetic), cu exceptia cazurilor când agentul patogen este polichimiorezistent, situatii in care boala poate avea sfârsit letal.

Incadrare taxonomica: Cls. *THALLOBACTERIA (Actinobacteria = Actinomycetes)*
Ord. *ACTINOMYCETALES*
Fam. *MYCOBACTERIACEAE*

Genul *MYCOBACTERIUM* ~ 70 de specii care se diferentiaza dupa gradul de patogenitate si dupa capacitatea de pigmentogeneza in doua grupe:

Complexul Mycobacterium tuberculosis – *M. tuberculosis* (Necromogen)
(micobacterii tuberculoase)
- *M. bovis* (**N**)
- *M. africanum* (**N**), izolat in Africa

Micobacterii netuberculoase conditionat-patogene – M. *fortuitum*} crestere
- M. *chelonei*} rapida
- *M. avium-intracellulare* (**N**)
- *M. kansasii* (**F**otocromogen)
- *M. scrofulaceum* (Scotocromogen)
- *M. ulcerans* (**N**)
- *M. marinum* (**F**)
- *M. xenopi* (Scotocromogen)

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Aceste specii de micobacterii netuberculoase, numite si atipice sau paratuberculoase, pot fi prezente la om si la animale, ca specii comensale pe piele si mucoase, ca si in mediul natural ca specii saprotrofe .

Caractere generale. *M. tuberculosis* se prezinta sub forma unor bacili incurbati – 0,3 – 0,4 μm / 1 μm, imobili, grupati in perechi sau in corzi (grupare determinata de prezenta cord-factorului in peretele celular), acidoalcoolorezistenti (AAR), obligat aerobi, cu capacitati de crestere si multiplicare lente. Speciile netuberculoase au o morfologie asemanatoare cu bacilul Koch .

Toate micobacteriile au un perete celular structurat asemanator, bogat in lipide. La microscopul electronic au fost evidentiate doua straturi strâns unite: 1) stratul intern care este compus din mucopeptide (mureina), confera rezistenta la liza si substante chemoterapeutice si determina forma celulelor; 2) stratul extern este compus din polipeptide si lipide: ceruri, fosfolipide, glicolipide (cord-factorul, care este si factor de virulenta), acizi micolici si micozide (dimicolat de trehaloza, care pot fi si receptori de fagi). Partea lipidica este expusa spre exterior; 60% din aceasta este reprezentata de acizii micolici care confera suprafetei celulare o hidrofobie marcata, cu un efect de evitare a patrunderii apei, acizilor, alcalilor si solventilor (alcooli si eteri). In timpul coloratiei diferentiale Ziehl-Nielsen, incalzirea realizeaza permealizarea peretelui celular, facilitând patrunderea colorantului; la racire, peretele celular revine la structura dinainte si colorantul nu mai poate fi scos de acizi si alcooli. Coloratia fluorescenta se bazeaza pe acelasi principiu. Acizii micolici sunt prezenti si la micobacteriile atipice, la *Nocardia sp.* (din Fam. *Actinomycetaceae*) - bacterii prezente si in tartrul dentar, ca si la *Corynebacterium sp.*

Patogenie. Expectoratia celor bolnavi sub forma de picaturi contine bacterii care sunt inhalate de catre cei din jur. Bacilul tuberculos nu produce toxine. Virulenta sa se datoreaza mai ales faptului ca este o bacterie parazita facultativ intracelular, care supravietuieste si se multiplica in macrofage, datorita producerii unei " proteine repetitive exportate" care impiedica fuziunea fagozomilor cu lizozomii si astfel nu poate fi degradata de enzimele lizozomale (chiar la persoanele tratate cu tuberculicide si vindecate din punct de vedere clinic, ramâne un numar mic de bacili tuberculosi in macrofage, care vor putea determina o recadere, când rezistenta organismului-gazda va fi mai scazuta, ceea ce demonstreaza caracterul de germeni oportunisti).

Infectia si boala se produc doar prin contact repetat si prelungit, bacilul tuberculos fiind un agent conditionat-patogen sau oportunist. In prezent se remarca tendinta de diseminare a agentului patogen in organism, care poate determina: tuberculoza pulmonara, dar si renala, genitala, osoasa (osteomielita tuberculoasa). Manifestarile tuberculozei pulmonare: anorexie,

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

astenie, febra, transpiratie nocturna, stare generala alterata, scadere ponderala, tuse si hemoptizie. Leziunile sunt dependente de raspunsul imun al gazdei (mediat celular). Leziunile pot di de doua tipuri: 1*) exudative* (raspuns inflamator acut la nivelul plamânilor) si 2) *granulomatoase;* acestea constau intr-o zona centrala de celule gigantice care contin bacili tuberculosi, inconjurata de o zona cu celule epitelioide. Un *tubercul* este un granulom inconjurat de tesut fibros care delimiteaza o zona centrala de necroza cazeificata. Tuberculii se vindeca prin fibrozare si calcificare. Se considera ca majoritatea infectiilor (90%) sunt asimptomatice.

Patruns pe cale digestiva, agentul patogen este distrus in mod normal de aciditatea gastrica. Tuberculoza gastrointestinala poate fi si cauza consumului de lapte nepasteurizat, provenit de la o vaca bolnava de tuberculoasa, agentul infectios (*Mycobacterium bovis*) fiind eliminat prin lapte. Nu se imbolnavesc persoanele cu un status imunologic normal.

Epidemiologie. In prezent, cea mai mare endemie tuberculoasa din Europa este in Romania : se inregistreaza annual aprox. 162 cazuri/ 100.000 locuitori, comparativ cu 200 cazuri (emigranti) in total in Suedia. Exista un program national de combatere a T.B.C., in colaborare cu O.M.S. Grupele de risc sunt considerate a fi: sugarii si tinerii intre 15 – 30 de ani (puberi, elevi, studenti).

Factori de risc interni: sexul - boala este mai frecventa la barbati, comparativ cu femeile (de 2 - 4x); vârsta 0 - 4 ani - receptivitate mare, datorita imaturitatii sistemului imunitar, 5 - 12 ani – rezistenta mare, 12 - 18 ani receptivitate mare, 20 - 25 – risc mare = vârsta ftiziogena (la aceasta vârsta se fac optiuni majore: profesie, casatorie, familie); boala ulceroasa, psihopatii, alcoolism, SIDA (la acesti pacienti - frecvente infectii oportuniste si cu *M. avium-intracellulare*).

Factori externi: statutul socio-economic care determina alimentatia, calitatea locuintei, educatia (raport O.M.S.- 98% din decese se inregistreaza in tarile in curs de dezvoltare; O.M.S. considera ca situatia globala este scandaloasa – 1,7 miliarde de oameni infectati).

Factori psihosociali: traume psihice, stari conflictuale prelungite, stress; factori profesionali - rol limitat; migrari de populatie; tabagismul- este implicat mai mult in etiologia cancerului pulmonar.

Alte specii implicate in patologia umana

Mycobacterium leprae (bacilul lui Hansen) este agentul patogen al leprei, maladie strict umana. Agentul patogen nu a putut fi cultivat *in vitro.* Dupa contaminarea pe cale cutanata, perioada de incubatie poate dura luni si ani de zile. Primele semne de boala sunt insidioase si se manifesta prin leziuni la nivelul pielii si mucoaselor si semne neurologice. Boala are o evolutie lenta, cu deformari si mutilari, spre *exitus,* care se produce prin casexie. Leziunea tipica este

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

lepromul, un granulom bogat vascularizat, infiltrat cu macrofage care au fagocitat numerosi bacili.

Micobacterii netuberculoase (paratuberculoase sau atipice). Sunt specii saprotrofe, foarte raspândite in sol, gunoi de grajd, ape uzate, unele alimente (lapte, legume), comensale la om si animale, prezente pe tegumente si mucoase, in anumite conditii isi pot manifesta potentialul patogen, comportându-se ca germeni conditionat – patogeni sau oportunisti. De exemplu, speciile de micobacterii prezente in microbiota bucala, la indivizii cu capacitate de aparare scazuta din diferite cauze, pot determina infectii ale tractului respirator numite micobacterioze benigne, cu diferite localizari: bronhopulmonare, ganglionare, cutanate, care pot evolua spre ulceratii si abcese. Mai putin frecvente sunt localizarile meningeale, osoase, oculare, genitale.

Ex. *Mycobacterium kansasii* (infectii pulmonare, asemanatoare tuberculozei - *tuberculosis -like*). *M. ulcerans* (specie prezenta in apa piscinelor), *M. fortuitum (*izolat din abcese determinate de injectii cu ace nesterile, ca si ale plagilor post chirurgicale*)*, *M. smegmatis, M. phlei, M.scrofulaceum.(* determina scrofularioza, o adenita cervicala).

Diagnosticul de laborator.

Recoltarea produsului patologic - sputa purulenta:

– **examen direct-** pe frotiuri colorate prin metoda Ziehl-Nielsen (este necesar deoarece pot fi prezenti bacili morti, datorita chemoterapicelor, astfel ca la cultivare, examenul poate fi fals negativ)- micobacteriile apar ca bacili colorati in rosu (acidoalcoolorezistenti -AAR), scurti, subtiri si adesea grupati "in coarda" sau "in mustata" (datorita cord-factorului, pe fondul albastru al preparatului (in care se pot observa alte bacterii neacidoalcoolorezistente, leucocite PMN, fibrile de fibrina)

- **cultura** – metodologie standard, adoptata si in tara noastra - prin centrifugare; microbiota cavitatii bucale 10^8 bacterii ; sputa se trateaza cu o solutie de Na OH, pentru distrugerea bacteriilor saprotrofe. B.K. este rezistent; apoi sputa se neutralizeaza, se centrifugheaza si din sediment se fac frotiuri si insamântari pe mediul Loewenstein-Jensen (cu galbenus de ou). Crestere lenta: 15-20-60 zile. Examenul va fi pozitiv, daca in produsul initial a fost o densitate de 10^5 celule/ml sputa (la pacienti cu leziuni mari). Prin concentrare (centrifugare) sensibilitatea testului creste de 10 ori (leziuni mici). *Nocardia,* prezenta in tartrul dentar, poata fi prezenta si in lichidul pleural. Incubare de lunga durata: 6 – 8 saptamâni, facând observatii periodice;

- examenul caracterelor de cultura si de colonie: coloniile de *Mycobacterium tuberculosis* sunt nepigmentate, conopidiforme, rugoase ("R");

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- test imunologic *in vivo*-I.D.R. la tuberculina (P.P.D.- *purified protein derivative de Seibert*); toate persoanele vaccinate in copilarie cu vaccinul antituberculos (B.C.G.) au o reactie slab pozitiva (o dovada a memoriei imunologice), dar cele bolnave de T.B.C. au o reactie intens pozitiva, indicata de o zona roseata si induratie, cu diametrul mai mare 15mm; reactia este de tip intârziat (exprimata in 48 de ore de la inocularea intradermica a tuberculinei), mediata celular.

Diagnosticul tuberculozei renale- urina concentrata (regim hiposodat, hipohidric, alimentatie exclusiv solida; bolnavul nu trebuie sa ia aspirina , paracetamol, vitamina C care inhiba BK), din doua zile, tratata cu NaOH, se injecteaza la cobai – cel mai sensibil la BK; daca exista 1 bacil, cobaiul se imbolnaveste; se urmareste 3 luni (ganglioni, splina , ficat, rinichi, plamani- se tritureza organele si se inoculeaza din nou).

Metoda fluorescentei

Colorantii fluorescenti *auramina* si *rhodamina* pot fi utilizati pentru a demonstra prezenta bacililor AAR. Evidentiate prin aceasta metoda, celulele bacteriene apar galbene pe fondul intunecat, când permanganatul de potasiu este folosit ca un colorant de contrast. Utilizarea acestei metode faciliteaza *screening*-ul frotiurilor, mai ales când este folosit un obiectiv de 25x. Aceste obiective furnizeaza o marire suficient de mica pentru a vedea punctele luminoase galbene care emana din bacteriile care au fixat substantele fluorecente. Mariri mai mari pot fi folosite pentru confirmarea unui rezultat pozitiv obtinut prin aceasta metoda.

Teste biochimice

- testul catalazei - micobacteriile fiind strict aerobe, sunt catalazo-pozitive;
- testul niacinei – este un test de "screening": tulpinile de *M. tuberculosis* sunt niacino-pozitive, producând si acumulând in mediu acest metabolit, pe când micobacteriile atipice sunt niacino-negative.
- Testul nitrat reductazei – reactie de culoare – *M. bovis* – reactie negativa; micobacteriile atipice – reactie pozitiva.
- Determinarea antibiotipului – micobacteriile atipice au o polichimiorezistenta nativa (la HIN, PAS, rifampicina); daca 1% din populatia bacteriana este rezistenta, este considerata in intregime rezistenta. Se fac dilutii pâna la 10^{-3} ale culturilor, pentru a prinde mutantele rezistente.
- Sistemul automat de cultivare si detectie a micobacteriilor *M.B. BACT (BACTEC)* este un sistem bazat pe detectie radiometrica. Se utilizeaza un mediu de cultura lichid care contine acid palmitic cu ^{14}C. Micobacteriile preiau si metabolizeaza acest compus, devenind radioactive. Monitorizarea colorimetrica a cresterii bacteriene se bazeaza pe un dispozitiv

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

reflectometric care inregistreza la fiecare 10 minute. La densitatea de 10^6 – 10^7 micobacterii/ml de mediu, apar semnale luminoase si sonore, care indica prezenta si pozitia in aparat (incubator special), in aprox. 2 saptamâni. Daca pâna acum o conditie a reusitei izolarii si cultivarii bacilului Koch din produsul patologic, era recoltarea acestuia inainte de inceperea tratamentului cu antibiotice, in prezent aceasta problema a fost depasita prin utilizarea unui mediu de cultura lichid cu adaos de carbune activ care absoarbe eventualele antibiotice din produsul inoculat .

- Identificare rapida : metode genetice (sonde de ADN).
- Deoarece **rezistenta la medicamente antituberculoase** (in special la HIN) este o problema in prezent, a fost imaginata recent o metoda moderna de detectare rapida (in câteva zile) a tulpinilor rezistente la izoniazida, care se bazeaza pe utilizarea *luciferazei* (enzima izolata de la licurici). Aceasta enzima emite lumina in prezenta ATP. Daca tulpina bacteriana izolata de la pacient este rezistenta, nu va fi afectata de agentul chemoterapeutic, va produce ATP si luciferaza adaugata in sistem va emite o lumina intensa ; daca bacteria este sensibila la HIN, cantitatea de ATP si implicit emisia de lumina vor fi mai reduse. Testul este foarte avantajos, având in vedere cresterea foarte lenta a bacilui Koch si timpul necesar pentru izolarea + testarea sensibilitatii agentului patogen , prea lung pentru ghidarea clinicianului in instituirea tratamentului.

Fig. 41. Imagine la microscopul optic a unui frotiu efectuat dintr-o cultura pozitiva de *Mycobacterium tuberculosis*, incubata la sistemul automat *M.B BACT (BACTEC)*; se observa bacili izolati (vezi sageata) si agregate bacteriene (marire: x 2500).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Fam. *Rickettsiaceae*

Costituie un grup de **bacterii parazite obligat intracelular**, dintre care unele sunt patogene pentru om si animale. Considerate initial ca microorganisme intermediare intre bacterii si virusuri, rickettsiile apartin in mod evident lumii bacteriilor prin urmatoarele particularitati:

- organizarea celulara de tip procariot si structura diferitilor constituienti;
- compozitia chimica complexa si prezenta unor markeri biochimici pentru procariote;
- prezenta unei activitati metabolice proprii;
- multiplicarea prin diviziune;
- natura parazitismului – obligat intracelular, diferit de parazitismul absolut al virusurilor;
- sensibilitatea la antibiotice (tetraciclina si cloramfenicol).

Din punct de vedere filogenetic, rickettsiile au fost la origine paraziti naturali ai artropodelor, de la care au trecut la mamifere si ulterior la om, prin intermediul vectorilor hematofagi. Acest punct de vedere este justificat de faptul ce rickettsiile se mentin in natura trecând in mod obligatoriu prin organismul unui artropod (insecte, capuse sau alt acarian), la care de multe ori se transmit pe verticala.

Morfologie. Rickettsiile prezinta un pleomorfism accentuat, având forma de coci izolati sau in perechi, cocobacili, filamente subtiri si flexuoase. Forma tipica a celulelor este cea de bacili, cu dimensiuni cuprinse intre 0,3 - 0,7 μm x 1,5 - 2,0 μm. Au perete celular tipic structurat pentru bacteriile Gram negative, dar se coloreaza greu prin metodele uzuale. La exterior este prezent peretele celular, care contine acid muramic si acid diaminopimelic (markeri biochimici pentru procariote. Unele specii prezinta si o microcapsula cu proprietati antigenice. La interiorul peretelui celular se afla membrana citoplasmatica. Citoplasma contine structuri cu aspect granular (ribosomi) si vacuole. Cromosomul bacterian (nucleosomul) este alcatuit din ADN (200-400 gene), reprezentând aprox. 10-20% din ADN-ul *E.coli.* O serie de particularitati ale acizilor nucleici, pledeaza de asemenea pentru apartenenta la lumea bacteriana; astfel, procentul de perechi de baze G-C variaza intre 30 – 45%, iar raportul ARN/ADN = 3,5.

Metabolism. Desi au un echipament enzimatic redus, rickettsiile sunt capabile de activitate metabolica independenta, deoarece au in echipamentul lor enzimatic enzimele necesare atât pentru producerea de energie (enzimele ciclului Krebs, citocromi), independent de gazda, cât si pentru activitatea de biosinteza.

Membrana fiind foarte permeabila, da posibilitatea enzimelor NAD si CoA sa patrunda in celula rickettsiana. Aceasta permeabilitate excesiva ar explica imposibilitatea rickettsiilor de

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

a supravietui in afara celulelor animale, deci **parazitismul lor obligat intracelular,** ca si **incapacitatea lor de a se dezvolta pe medii artficiale.** Se cultiva in laborator pe oua de gaina embrionate, cu embrioni in varsta de 6-7 zile sau pe culturi celulare.

Nu se cunosc mecanismele moleculare care le permit sa creasca si sa se multiplice in fagolizozomi, care reprezinta in general un mediu nefavorabil pentru alte bacterii si nici cauzele parazitismului lor intracelular, in legatura cu care s-au emis mai multe ipoteze:

- permeabilitatea excesiva a membranei plasmatice, care in mediul extracelular s-ar manifesta unidirectional (din interior spre exterior) ceea ce ar face imposibila viata autonoma a celulelor bacteriene;
- desi au metabolism energetic, de indata ce patrund in celula ar deveni dependente de energia celulei gazda;
- ar avea o stare de auxotrofie neidentificata (incapacitati de sinteza nedecelate inca, satisfacute de celulele gazda parazitate, care le ofera factorii de crestere necesari);
- rickettsiile ar fi microorganisme cu mecanisme de reglare foarte sensibile si de aceea s-au adaptat riguros la partcularitatile mediului intracelular.

Multiplicarea rickettsiilor se realizeaza de regula prin diviziune simpla, transversala, in citoplasma celulelor gazda (vertebrate si artropode) si numai unele specii se multiplica in nucleul celuleor-gazda.

Multiplicarea in laborator se practica prin mai multe modalitati:

- cultivarea pe oua de gaina embrionate in vârsta de 5-6 zile, metoda care asigura obtinerea de masa celulara bacteriana in cantitati mari, motiv pentru care aceasta metoda se foloseste pentu producerea antignelor de diagnostic, a vaccinurilor, ca si in cercetarea acestor bacterii;
- cultivarea pe culturi de celule si tesuturi, mai ales in vederea studiului interrelatiilor celula gazda – parazit;
- cultivarea pe artropode (vectori naturali si rezervor de infectie); la acestea, rickettsiile sunt inofensive, dar transmise omului produc boli grave;
- inocularea la animale de laborator, practicata cu scopul de a se face izolari primare, studii de infectiozitate si imunogenitate.

Incadrare taxonomica. Pozitia sistematica a acestui grup (dupa Bergey, 1986) este urmatoarea:

Ord. *Rickettsiales,*
Fam. ***Rickettsiaceae*** , cu urmatoarele genuri importante din punct de vedere medical:
1. Genul *Rickettsia sp.*
2. Genul *Coxiella sp.*
3. Genul *Rochalimaea sp.*

In prezent genului *Rochalimaea* i s-a schimbat denumirea si incadrarea (vezi Fam. ***Bartonellaceae)***

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Patogenia rickettsiilor

Rickettsiile produc boli la om si animale, numite generic *rickettsioze*, manifestate clinic prin eruptii cutanate (exantem), febra, cefalee, stare generala alterata, ca si prin leziuni proeminente in piele. Mecanismul de producere al acestora este urmatorul: rickettsiile se multiplica in celulele endoteliale ale capilarelor pielii si determina fenomene de hiperplazie, tomboza si necroza la acest nivel.

Reprezentanti:

Fam. *Rickettsiaceae*

1. *Rickettsia prowazecki* - agentul etiologic al tifosului exantematic, boala cu caracter epidemic. Acest agent patogen este sensibil la tetraciclina si cloramfenicol si se transmite prin vectori hematofagi (paduchii de cap sau de corp). Multiplicarea bacteriilor are loc in celulele intestinale ale insectei, eliminându-se odata cu excretele insectei pe pielea omului parazitat si patrunzând in organismul acestuia prin leziunile de grataj. Bolnavul pastreaza pentru toata viata un numar mic de bacterii cantonate in ganglionii limfatici, splina. In perioada când organismul are o capacitate de aparare mai scazuta, bacteriile parasesc organele limfoide si se produce o infectie usoara, o recadere- denumita tifos de recadere. In aceasta perioada bolnavul este contagios, ca si in timpul infectiei initiale.

2. *Rickettsia rickettsii* - agentul etiologic al bolii cunoscuta ca "febra muntilor Stâncosi ", transmis prin capuse.
3. *Rickettsia conorii* - agentul etiologic al bolii cunoscuta ca "febra butonoasa", transmis prin capusa de câine in Sud - Estul Europei (la noi intara, mai ales in Dobrogea).

4. *Coxiella burnetii* - agentul etiologic al bolii cunoscuta ca „tifos pulmonar" sau „febra Q" (de la numele provinciei Queensland din Australia, in care a aparut si a fost descrisa pentru prima data, ca si de la initiala termenului englez ***query*** = intrebare, termen care sugereaza faptul ca la data descrierii bolii, agentul patogen era necunoscut).

Initial, bacteria a fost studiata si inclusa de catre Cox in genul *Rickettsia* dar deosebirile au necesitat incadrarea ei intr-un gen aparte. Bacteria este mult mai mica, filtrabila prin filtrele bacteriologice, este sensibila la cloramfenicol si sulfamide. Are o rezistenta crescuta la actiunea agentilor fizici (caldura, radiatii) si chimici, pastrându-si viabilitatea la temperatura camerei pâna la un an, rezistenta care este mai mare decât a tuturor bacteriilor nesporogene cunoscute. Bacteria se multiplica extracelular si prezinta fenomenul variatiei de faza (I si II, cu

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

antigenitate diferita), fenomen similar cu cel al variatiei morfologice si antigenice a celorlalte bacterii, care formeaza colonii de tip S si de tip R.

Transmiterea acestui agent patogen se face prin intermediul capuselor (de ex. *Rhipicephalus*, in Oltenia), ale caror excrete ajung in aerosoli, patrunzând apoi in corpul gazdelor, in special pe cale respiratorie, dar si digestiva si transcutanata. Desi tifosul pulmonar este o boala aparent mai putin grava, se pot produce adevarate explozii epidemice, in perioadele de transfer al turmelor. Sunt expusi si indivizii care lucreaza in industria carnii si a laptelui.

Bartonella sp.

1. Bartonella quintana (denumirea initiala *Rickettsia quintana,* redenumita apoi *Rochalimaea quintana)* - agentul etiologic al bolii cunoscuta ca febra de transee, descrisa in primul razboi mondial (1917) si semnalata din nou in cel de al doilea si apoi in perioadele de mari concentrari umane (refugiati), situatii in care nu pot fi asigurate conditiile minime de igiena. Boala nu este mortala, dar are o evolutie lunga, de luni de zile, manifestându-se cu febra ondulanta, dureri de spate si membre. Agentul patogen este transmis de paduchele de corp, in intestinul caruia creste extracelular. Trecerea de la o gazda la alta, determina cresterea virulentei. Este un parazit facultativ intracelular, astfel ca se poate multiplica si pe medii acelulare (geloza-sânge) in atmosfera de CO_2. Incadrarea sa initiala intre rickettsii s-a facut exclusiv pe baza caracterelor epidemiologice, respectiv transmiterea prin vectori hematofagi. In prezent insa, pe baza rezultatelor metodelor moleculare, de amplificare genica si secventiere a moleculelor de ARNr 16S, denumirea si incadrarea taxonomica a genului *Rochalimaea* a fost schimbata in *Bartonella* (1993).

Aceasta specie poate fi si agentul cauzal al altor maladii umane, cum ar fi: angiomatoza bacilara (proliferarea vasculara cutanata sau subcutanata, cu posibilitatea extinderii la organele interne; semne vizibile: papule sau noduli friabili, hemoragici)- afectiune prezenta mai ales la indivizi cu imunodeficiente – de exemplu, la persoanele infectate cu virusul HIV), endocardita, adenopatii cronice.

2. *Bartonella henselae* – specie transmisa mai ales prin muscatura sau zgârietura pisicilor, dar si de catre de puricii (*Ctenocephalides felis*). Rezervorul natural de infectie este pisica, majoritatea pisicilor fiind purtatoare asimptomatice. *Bartonella henselae* determina la om « maladia ghearelor de pisica » sau adenopatia febrila a copilului si a tinerilor imunocompetenti (fiind necesar diagnosticul diferential fata de alte adenopatii). Adenopatia

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

unica sau multipla se insoteste de febra si boala poate evolua cu complicatii : hepatosplenomegalie, dureri abdominale, atingeri nervoase si osoase. In forma fara complicatii, regresia adenopatiei este de obicei spontana, dar lenta (6-12 luni) si nu se recomanda tratamentul cu antibiotice. Agentul patogen este sensibil la ciprofloxacin si rifampicina. Aceasta specie mai poate determina si conjunctivita, angiomatoza bacilara, endocardita.

Diagnosticul de laborator al rickettsiozelor

- inocularea produselor patologice pe animale mici de laborator si pe oua embrionate si efectuarea de frotiuri din lichidele si tesuturile in care se multiplica bacteriile;
- diagnosticul bacteriologic (direct) - se bazeaza pe recoltarea de produse patologice (probe de sânge) si inocularea acestora la animale mici de laborator, pe oua embrionate sau pe culturi de celule. Dupa incubarea acestor substraturi celulare, se fac frotiuri care se coloreaza prin metoda speciala Gimenez. La examinarea acestora la microscopul optic cu obiectivul de imersie, se pot observa rickettsiile colorate in rosu stralucitor, pe fondul albastru al preparatului (celule embrionare);
- diagnosticul imunologic (indirect) se face prin teste *in vitro* : reactii de aglutinare pe lama (cu antigen rickettsian si ser de cercetat, reactia de paraaglutinare Weil-Felix – in tub, care utilizeaza cultura de *Proteus OX19*, tulpina care reactioneaza incrucisat cu anticorpii anti- *Rickettsia prowazeckii* dintr-un ser de cercetat; reactia de fixare a complementului (RFC) cu antigen rickettsian si ser de cercetat; tehnica imunoenzimatica ELISA; metoda imunofluorescentei si teste *in vivo :* teste cutanate de hipersensibilitate la antigene rickettsiene ;
- metode genetice – pentru diagnosticarea infectiilor determinate mai ales de specia *Bartonella henselae,* specie cu crestere foarte lenta *in vitro* (15 – 40 zile). Metodele genetice sunt preferate (chiar daca necesita excizia unui ganglion) si datorita reactiilor imunologice incrucisate intre anticorpii anti- *Bartonella* si antigene ale speciilor *Coxiella burnetii, Chlamydia sp.*

Chlamydia sp.

Genul *Chlamydia* grupeaza trei specii importante pentru patologia umana: *C. trachomatis, C. psittaci, C. pneumoniae.*

Chlamidiile sunt **microorganisme procariote, parazite obligat intracelular,** producând infectii si boli la om si animale.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Datorita faptului ca nu cresc pe medii artificiale au fost considerate virusuri mari, anvelopate (denumirea insasi a grupului deriva de la grecescul *chlamydos* care inseamna manta). Ulterior s-a demonstrat ca sunt bacterii, deoarece prezinta numeroase elemente structurale, compozitie chimica si caracteristici fiziologice bacteriene : organizare celulara de tip procariot, perete celular asemanator bacteriilor Gram negative, nucleoid alcatuit din aproximativ 600 gene (~ 25% din genomul bacteriei *E. coli*), prezenta celor 2 acizi nucleici - ADN si ARN, inmultire prin diviziune binara, metabolism propriu - rudimerntar, sensibilitate la antibiotice. Pe lânga faptul ca sunt parazite obligat intracelular (preluând din celula gazda aminoacizi, factori de crestere, nucleotide, NAD, CoA), parazitismul chlamidiilor prezinta o particularitate deosebita : sunt incapabile sa sintetizeze compusi macroergici, astfel ca utilizeaza ATP din celula gazda, fiind considerate si *parazite pentru energie*.

Cultivare. Fiind parazite obligat intracelular, chlamidiile se cultiva numai pe substraturi celulare, fie in sacul vitelin al oualor embrionate in vârsta de 6-7 zile la temperatura de 35°C, fie pe culturi de celule.

Ciclul de dezvoltare este specific, unic in lumea bacteriilor si se desfasoara astfel:

- *faza extracelulara,* foarte infectioasa, numita *corp elementar,* are forma cocoidala, cu dimensiuni de 0,2-1,5μm, care adera la membrana celulei gazda la nivelul unor receptori specifici (cu resturi de acid sialic), apoi prin endocitoza patrunde in celula gazda intr-un fagosom. Aici are loc o activare a corpilor elementari, activare care implica modificari structurale si functionale (dispare peretele celular si de asemenea nucleoidul, genomul ADN trecând din faza nefunctionala, compacta, in faza functionala, de retea laxa, accesibila enzimelor de transcriere si replicare;

-*faza intracelulara*, neinfectioasa, reprezentata prin *corpul reticulat* (denumire datorata genomului care se prezinta sub forma unei retele fibrilare laxe, pregatita pentru multiplicare), forma vegetativa a chlamidiilor, cu dimensiuni de 1,0 - 1,6 μm, cu numerosi ribosomi 70S in citoplasma, care sintetizeaza metaboliti toxici care determina leziuni celulare. Corpii reticulati sunt situati in vacuole citoplasmatice unde se multiplica prin diviziuni binare repetate, prin fragmentare sau prin inmugurire, rezultând *corpi elementari progeni (corpi de incluziune),* care se elibereaza dupa maturare, prin ruperea membranei celulei gazda. Acestia infecteaza celulele sensibile invecinate, reluând ciclul si contribuind la propagarea infectiei (fig. 42).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

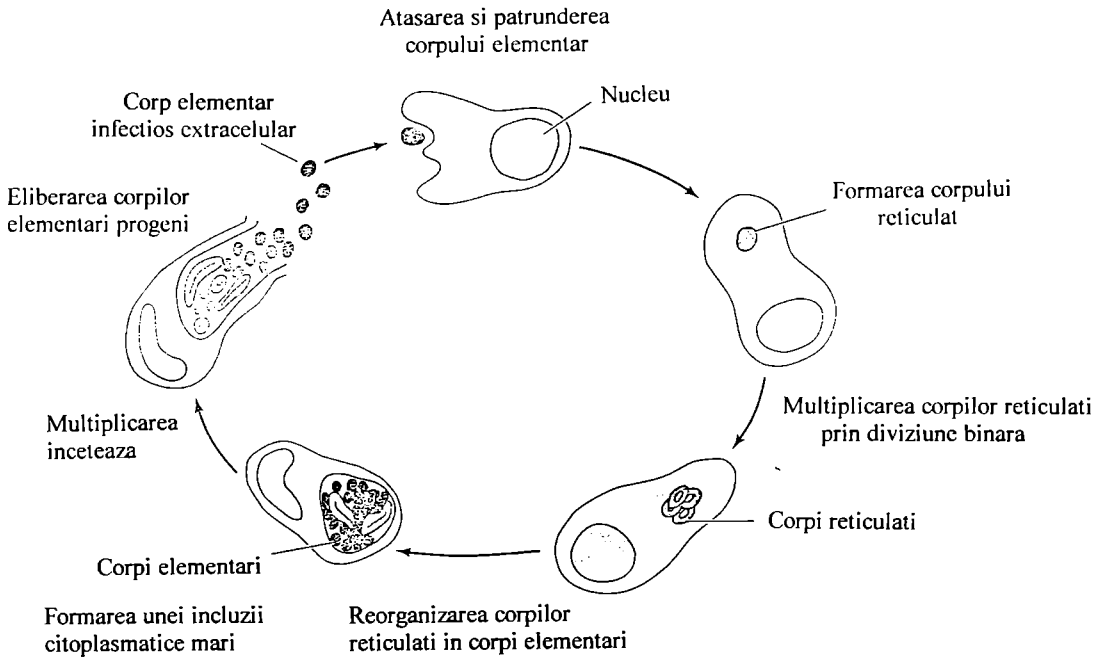


Fig. 42. Schema ciclului de viata al bacteriilor incadrate in *Chlamydia sp.*

Morfologie. Chlamidiile au forme cocoidale (∅ = 0,2 - 1,5μm), care se evidentiaza prin colorarea frotiurilor efectuate din sacul vitelin al oualor inoculate cu produse patologice, utilizând metode speciale de colorare (Gimenez, Machiavello, Giemsa). Pe frotiurile colorate prin metoda Gimenez, examinate la microscopul optic, cu obiectivul de imersie, se pot observa corpi de incluziune, colorati in rosu, pe fondul albastru al celulelor sacului vitelin.

Patogenie.

Chlamidiile au un spectru larg de gazde, infectând plante, insecte, vertebrate, inclusiv omul.

1. *C. trachomatis,* una din cele trei specii de chlamidii, este un parazit al speciei umane, fiind agentul patogen al unor infectii cu diferite localizari : oculara, orala, urogenitala. Infectia oculara determina boala denumita trachom, freventa in Orientul Mijlociu si in Africa, ca si conjunctivite neonatale si conjunctivita piscinelor. In cazul localizarii la nivelul aparatului genito-urinar, aceasta poate conduce la uretrite si limfogranulomatoza inghinala. *C. trachomatis*, este cunoscuta a fi unul din agentii etiologici majori ai infectiilor urogenitale asociate cu salpingita, sarcina ectopica si sterilitate la femei, ca si agent al uretritei negonococice si ai epididimitei la barbat. La femeie, localizarea cea mai frecventa a infectiei este la nivelul cervixului; infectia poate fi asimptomatica si daca nu este tratata, agentul patogen se deplaseaza ascendent spre uter, tropele utrine si ovare si poate determina o boala inflamatorie a pelvisului. Nou-nascutii mamelor infectate pot contracta conjunctivita, infectii nazofaringiene si pneumonii.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

C. trachomatis de obicei se transmite prin contact personal apropiat (contact sexual sau in cursul nasterii). Indivizii cu infectii genitale asimptomatice constituie un important rezervor de infectie pentru altii. In trahom, agentul patogen se transmite prin contactul conjunctivei cu mâini murdare.

Bolile determinate de acest agent patogen sunt prezente in toata lumea, dar trahomul este mai frecvent in tarile in curs de dezvoltare, in regiunile calde, secetoase. S-a observat ca uretrita negonococica determinate de *C. trachomatis* este mai frecventa la indivizi cu un statut socioeconomic ridicat, spre deosebire de gonoree, care este predominanta la indivizi cu un statut socioeconomic scazut. Totusi, cele doua boli nu se exclud, putând fi prezente simultan la acelasi individ.

2. *C. psittaci* este o specie frecventa mai ales la pasari, dar si la mamifere (inclusiv la om) si chiar la insecte. Datorita unui component al peretelui celular, aceste bacterii stimuleaza endocitarea de catre celulele animale la membrana carora adera. Acest agent patogen produce infectii latente, inaparente la purtatori, dar trecerea de la o gazda la alta determina cresterea virulentei. Astfel, acest agent infectios transmis de papagali si porumbei omului, mai ales pe cale aerogena, prin inhalare de praf care contine excremente uscate de la pasari infectate, determina boli grave numite *psitacoze*. Ornitozele sunt boli transmise omului si animalelor, prin aerosoli, de catre gaini, rate, curci, care pot fi, de asemenea, purtatoare ale acestui agent patogen.

Psitacozele si ornitozele (care fac parte din categoria antropozoonozelor) se manifesta prin tuse, rinoree, dureri de cap, mialgii. La ovine, bovine, porcine acest agent patogen poate fi cauza unor enterite, poliartrite, placentite, pneumonii.

3. *Chlamidya pneumoniae* este o specie care a fost izolata pentru prima data in 1965 in Taiwan. In 1986 aceasta specie a fost recunoscuta ca o cauza a infectiilor respiratorii acute, fiind desemnata cu acronimul TWAR (Taiwan acute respiratory). In 1989 a fost desemnata ca o specie distincta de celelalte doua specii similare, patogene pentru om ale genului *Chlamydia*: *C. trachomatis si C. psittaci.* Specia *C. pneumoniae* poate exista in trei forme: *corp elementar*, *corp reticulat* si *corp persistent*. *Corpul elementar* este infectios si poate invada celulele endoteliale si monocitele gazdei, dupa patrunderea pe cale respiratorie. Dupa patrunderea in celulele gazda prin endocitoza, corpul elementar se diferentiaza in corp reticulat care se multiplica prin diviziune binara, in vacuole numite *corpi de incluziune*. Corpii reticulati, dupa diviziune, revin la stadiul de corpi elementari, care sunt eliberati prin liza

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

celulei gazda, initiind un alt ciclu de viata. Totusi, corpii elementari pot in mod imprevizibil sa evolueze intr-o forma metabolic inactiva numita *corp persistent*, care poate ramâne intr-un stadiu dormant perioade lungi de timp. Corpii persistenti nu sunt accesibili sistemului imunitar si substantelor antibiotice terapeutice.

C. pneumoniae infecteaza numai omul si se transmite de la persoana la persoana prin aerosoli. *C. pneumoniae* determina infectii cu o mare varietate de manifestari clinice – in special ale tractului respirator superior, in toata lumea. In tarile industrializate, poate fi cauza unor epidemii cu o perodicitate care variaza intre 4 – 7 ani, adultii de vârsta mijlocie fiind seropozitivi in proportie de 50 – 70 %.

In ultimii ani, anumiti autori afirma existenta unei legaturi intre inflamatiile de etiologie infectioasa si ateroscleroza. Anumiti agenti infectiosi specifici au fost identificati ca potentiali agenti cauzali ai inflamatiei si procesul de aterogeneza si aterotromboza, printre care: agenti virali (adenovirus, citomegalovirus, virusul coxsackie B, agenti bacterieni – streptococi, ***Chlamydia pneumoniae***, *Helicobacter pylori, Mycoplasma fermentans, Coxiella burnetii.* Studii epidemiologice care au indicat o corelatie intre markeri ai infectiilor cu *C. pneumoniae* (anticorpi, complexe imune) si ateroscleroza, au fost publicate incepând cu anul 1988. Dovezi ale relatiei cauza – efect dintre infectiile cu *C. pneumoniae* si ateroscleroza au fost furnizate de investigatiile sero-epidemiologice, histopatologice, de studiile de patogenitate pe modele animale, de biologie moleculara si imunologie, ca si de cele privind influenta antibioticelor asupra acestei relatii.

Diagnosticul de laborator.

- diagnosticul bacteriologic (direct) - se bazeaza pe recoltarea de produse patologice (secretii ale mucoaselor infectate) si inocularea acestora pe oua embrionate sau pe culturi de celule. Dupa incubare, se fac frotiuri care se coloreaza prin metoda speciala Gimenez sau prin metoda Giemsa. Pe frotiurile colorate (metoda Gimenez, examinate la microscopul optic cu obiectivul de imersie, se pot observa corpi de incluziune intracitoplasmatici, colorati in rosu, pe fondul albastru al celulelor sacului vitelin ;
- diagnosticul imunologic (indirect) : prin metode imunoenzimatice **calitative** (de *screening*- lame de plastic cu antigen chlamidial adsorbit pe suport de hârtie de filtru, care se pune in contact cu o picatura de ser de bolnav; in cazul unui test pozitiv se produce o reactie de culoare, usor de citit si interpretat) si **cantitative tip ELISA**;
- metode genetice.

Diagnosticul infectiilor cu *C. trachomatis* prin **metode moleculare** (LCx *Chlamydia trachomatis* assay) se bazeaza pe reactia de amplificare LCR (*Ligase Chain Reaction*) pentru

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

detectarea directa, cantitativa a unei plasmide caracteristice acestei specii, prezente in probele de secretie vaginala sau uretrala, recoltate cu tamponul sau in probele de urina de la indivizi cu infectii simptomatice sau asimptomatice. Probele sunt tratate pentru ruperea peretilor celulari, separarea catenelor de ADN, prin incalzirea probelor in tamponul de transport al acestora.

Principiul metodei de amplificare LCR. Testul detecteaza o plasmida criptica prezenta la toate serovarurile, in aprox. 10 copii/ corp elementar sau corp reticulat. Secventa de ADN tinta a acestei reactii este localizata pe aceasta plasmida si este inalt conservata la toate serovarurile de *C. trachomatis,* nu si la alte specii. Testul utilizeaza 4 probe de oligonucleotide, complementare secventei tinta, pe care o recunosc si hibridizeaza cu aceasta, astfel ca secventele oligonucleotidice vor fi adiacente, moment in care pot fi legate (reunite) enzimatic, rezultând un produs de amplificare. Acesta, serveste ca tinta secundara pentru rundele ulterioare de amplificare, produsul acesteia fiind detectat cu ajutorul unui analizor *Abbot LCx.*

BACTERII CU PERETE CELULAR FLEXIBIL

Treponema pallidum

Treponema pallidum (= spirocheta palida) este o bacterie spiralata, netoxigena, inalt patogena, care se raspândeste prin contact interuman, sexual cel mai adesea, fiind agentul patogen al bolii numita sifilis sau lues. *T. pallidum* are o foarte larga distributie; Organizatia Mondiala a Sanatatii estimeaza ca exista 12 milioane de cazuri noi pe an de sifilis in toata lumea. Sifilisul ramâne o problema, mai ales in tarile in curs de dezvoltare, datorita sechelelor si riscului de infectii congenitale. Varietatea simptomelor clinice care insotesc boala si similaritatea lor cu simptomele altor boli, au determinat medicii sa supranumeasca sifilisul « marele imitator ».

Morfologie. Este o bacterie spiralata, cu dimensiuni ca variaza intre 0,2 / 5 – 20 μm, mobila; acest caracter – mobilitatea, este de tip particular, nemaiîntâlnit in lumea procariotelor. Deplasarea se realizeaza cu ajutorul unor filamente axiale (axostil), numarul acestora variind intre 2 – 15/ celula si care se rotesc in jurul cilindrului protoplastului helical (alcatuit din constituenti citoplasmatici si nucleari, membrana plasmatica si perete celular). Aceste structuri sunt invelite de o membrana subtire, semipermeabila, numita *teaca externa* sau *invelisul celular extern*, alcatuita din proteine (60 – 70%), lipide (4 – 25%), glucide (1 – 27%). Prezenta tecii face ca filamentele axiale, asemanatoare flagelilor ca structura si compozitie chimica, sa fie structuri endocelulare, localizate intre peretele celular si teaca externa.

Epidemiologie. *T. palidum* intra in organism prin leziuni minime ale pielii sau mucoaselor (rani, leziuni sau pe la nivelul foliculilor pilosi), dar poate penetra si epiteliul intact

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

al mucoaselor. Agentul patogen se poate transmite nu numai pe orizontala la alti indivizi, prin contact sexual, ci si vertical la fat, pe cale transplacentara.

Rezistenta agentului patogen in mediul extern. Transmiterea acestui agent patogen necesita contact direct persoana – persoana (in proportie de 90% se transmite prin contact sexual), datorita faptului ca aceasta bacterie nu supravietuieste in afara corpului si este foarte sensibila la oxigen (este microaerofila), uscaciune, caldura si dezinfectanti.

Patogenie. Bacteriile se multiplica foarte lent, timpul de generatie fiind de 33 de ore, astfel ca perioada medie de incubare dupa patrunderea agentului patogen in organism este de 3 saptamâni. Multiplicarea locala conduce la infiltrarea cu polimorfonucleare, macrofage si plasmocite si arterita consecutiva. Infectia cu *T. pallidum* evolueaza in 3 stadii: sifilis primar, secundar si tertiar. Totusi nu toti pacientii trec prin toate cele 3 stadii; o proportie substantiala ramâne permanent libera de boala dupa trecerea prin stadiul primar si secundar. Acest stadiu poate fi urmat de o perioada de latenta de 3 – 30 de ani, dupa care boala poate reveni, trecând in stadiul tertiar. Spre deosebire de alti agenti patogeni bacterieni, *T. pallidum* poate supravietui in organism pentru multi ani, in ciuda raspunsului imun prezent. S-a sugerat ca treponemele ramân neafectate de mecanismele de aparare ale organismului (de recunoastere si eliminare a ceea ce este strain) datorita suprafetei celulare bogate in lipide. Acest strat este inactiv din punct de vedere antigenic si antigenele sunt nemascate doar la bacteriile moarte, fata de care organismul este capabil sa raspunda imunologic. Leziunile tisulare se datoreaza mai ales reactiilor gazdei.

In ciuda multor ani de incercari, *T. pallidum* a ramas in continuare o bacterie necultivabila in laborator pe medii artificiale, ceea ce a facut dificil studiul posibililor factori de virulenta la nivel molecular, desi multe gene au fost clonate in *E. coli* si au fost caracterizate proteine majore.

In primul stadiu al bolii - **sifilis primar** este prezent sancrul sifilitic, o ulceratie circulara, rosie, nedureroasa, cu margini ridicate si tari, descrise ca având consistenta cartilajului, care apare la locul de intrare al spirochetelor, adesea reprezentat de mucoasa genitala. Dar orice zona a pielii poate fi afectata : faringe, rect, buze (cu secole in urma, desi nu stiau ce anume determina aceasta boala grava, oamenii au observat ca sifilisul se poate transmite prin sarut si atunci au inceput sa inlocuiasca sarutul pe buze, cu strangerea de mâna si sarutul pe obraz). In sancru se pot evidentia spirochete. Aceasta leziune persista 2 – 6 saptamâni, dupa care dispare spontan.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Sifilisul secundar se caracterizeaza prin febra si simptome specifice starii gripale (*influenza - like*), ca si prin tumefierea ganglionilor limfatici regionali. Roseata pielii care apare, poate fi confundata cu un semn al pojarului, rubeolei sau varicelei. Poate sa apara pierderea parului sprâncenelor si de pe cap (zone limitate). Suferinta hepatica se poate manifesta prin icter si astfel poate exista suspiciunea de hepatita. La pacientii netratati, simptomele pot dura câteva saptamâni, timp in care moartea poate sa survina. Majoritatea pacientilor isi revin, dar ramân cu cicatrici ale leziunilor. Acesti indivizi intra intr-un stadiu de latenta a bolii, in timpul careia ramân infectiosi.

Aproximativ o treime din pacientii netratati pot evolua spre **sifilisul tertiar.** Acest stadiu poate avea un tablou clinic diferit, dar cel mai adesea implica pielea, sistemul cardiovascular si sistemul nervos. Simptomul patognomonic al acestui stadiu sunt *gomele sifilitice*, leziuni moi, granulare. In sistemul cardiovascular, gomele slabesc rezistenta peretilor vaselor mari, care se umfla si pot exploda. In maduva spinarii si meninge, gomele conduc la degenerescenta tesutului (*tabes*) si eventual la paralizie. La nivelul encefalului, gomele pot altera personalitatea si ratiunea pacientului.

Sifilisul constituie o problema deosebita pentru femeia insarcinata, deoarece spirochetele sunt capabile sa traverseze bariera placentara si sa genereze **sifilisul congenital,** transmis de mama infectata, fatului *in utero*, ce poate fi dobândit dupa primele 3 – 4 luni de sarcina. Boala se poate manifesta ca:

- Infectie grava care poate conduce la moarte intrauterina;
- Anomalii congenitale care pot fi evidente la nastere (meningita);
- Infectie latenta, care poate ramâne inaparenta pâna aproape de vârsta de 2 ani , când se poate manifesta sub forma unor diformitati faciale sau ale dintilor.

Copiii afectati pot manifesta si asa-numita *triada Hutchinson* (descrisa pentru prima data la Londra – 1861, de catre J. Hutchinson), care este o combinatie de : surzenie, vedere slaba, dinti in forma de cui.

Pentru a putea controla sifilisul sunt foarte importante masurile de depistare a bolii si tratarea persoanelor bolnave, ca si a contactilor acesteia. Antibioticul de electie pentru sifilisul primar, secundar si stadiile latente ale bolii este penicilina, dar antibioticele sunt ineficiente in sifilisul tertiar, deoarece gomele constituie o manifestare a raspunsului imun fata de spirochete.

T. pallidum se multiplica foarte lent in tesuturi, ceea ce constituie un factor care contribuie la succesul antibioterapiei.

Diagnosticul de laborator al sifilisului

Agentul patogen neputând fi cultivat *in vitro*, diagnosticul de laborator se face prin **microscopie directa** si **serologie**. In stadiul primar, diagnosticul se poate face prin observarea

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

spirochetelor din sancru, la un microscop cu fond intunecat sau prin efectuarea de preparate colorate prin metoda impregnarii argentice (Fontana – Tribondeau) (fig. 43). Pe masura evolutiei bolii, se pot efectua o serie de **teste serologice**, de evidentiere a prezentei anticorpilor, cum ar fi :

- testul rapid de evidentiere a reaginei plasmatice ;
- testul de floculare (aglutinare) tip VDRL (*venereal disease research laboratory*);
- testul de imunofluorescenta indirecta , utilizând lame pe care s-au fixat antigene treponemice;
- reactia de fixare a complementului (R.F.C.), tip R.B.W. (reactia Bordet-Wassermann), care se utilizeaza in diferite variante metodologice, macro- si micrometoda, la cald si la rece, calitativa si cantitativa, cu antigen nespecific (cardiolipinic) care reactioneaza incrucisat cu anticorpii anti-treponemici.

De asemenea, sunt disponibile si o serie de teste specifice, care utilizeaza antigene treponemice (cu Ag de grup si strict specifice, extrase din celulele speciei *Treponema pallidum,* tulpinile Nichols sau Reuiter), folosite pentru confirmarea testelor de triaj (*screening*) al populatiei.

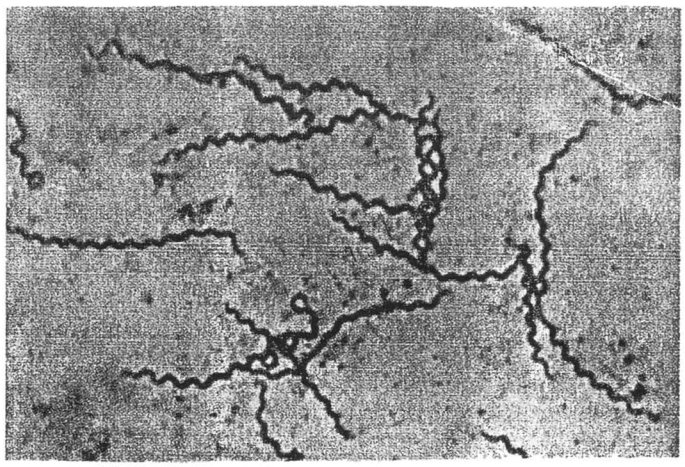


Fig. 43. *Treponema pallidum.* Imagine microscopica a spirochetelor, evidentiate pe un preparat colorat prin metoda Fontana – Tribondeau (marire : x 1000).

BACTERII FARA PERETE CELULAR

Micoplasma sp.

Micoplasmele sunt bacterii mici, lipsite de perete celular, delimitate de o membrana lipoproteica, cu o compozitie chimica asemanatoare celulelor animale. Sunt cele mai mici si mai primitive microorganisme capabile sa creasca autonom pe mediu acelular. Au fost descrise si denumite initial cu acronimul PPLO = *pleuropneumonia like-organisms* (= organisme asemanatoare cu agentii patogeni ai pleuropneumoniei bovinelor, numiti pe scurt PPO = *pleuropneumonia organisms*). Au izolate si cultivate pentru prima data in 1890, de catre Nocard si Roux.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Incadrare taxonomica. Aceste microorganisme sunt incadrate in:

Diviz. a IV-a. *Mendosicutes* (lat. *mendosus* = fals; *cutes* = piele)

Clasa *Mollicutes* (lat. *molli* = moale, pliabil) ;

Fam. *Mycoplasmataceae*

-genuri reprezentative pentru patologia umana :

Mycoplasma sp.

Ureaplasma sp. (cu o specie izolata din probele clinice *U. urealyticum).*

Morfologie. Datorita lipsei peretelui celular au o plasticitate naturala foarte mare, tradusa prin polimorfism celular, prezentându-se sub forme cocoidale sau filamentoase (*M. hominis, M. pneumoniae*). Desi nu au perete celular (cu rol esential in determinarea proprietatilor tinctoriale), sunt considerate bacterii Gram negative, cu dimensiuni care variaza intre 150 - 1000 nm (cele mai mici având dimensiuni cuprinse intre 125 – 150 nm), ceea ce le confera capacitatea de a traversa filtrele de membrana care retin bacteriile cu perete celular (∅ porilor = 450 nm).

Mobilitate. Exista atât specii mobile, cât si specii imobile. Mobilitatea se realizeaza prin miscari de alunecare pe suprafete acoperite de lichide.

Ultrastructura. Examinarea electronomicroscopica evidentiaza o organizare simpla, existând totusi structurile esentiale pentru crestere si multiplicare.

Componente celulare:

- membrana plasmatica delimiteaza citoplasma si este de natura lipoproteica (aproximativ 25% din lipide fiind reprezentate de colesterol);

- materialul nuclear este reprezentat printr-o molecula de ADN, care constituie cel mai mic genom din lumea microorganismelor (fiind echivalent cu 1/6 din cromosomul bacteriei *E. coli*) si care contine cantitea de informatie minima necesara pentru reproducerea autonoma. Continutul in (G+C) al ADN este extrem de scazut, explicând necesitatile lor complexe nutritionale si modul de viata parazitar.

- ribosomi 70S, care confera sensibilitate la antibiotice care inhiba proteosinteza: tetraciclina, eritromicina s.a.;

* lipsa peretelui celular le confera marea plasticitate morfologica, capacitatea de a traversa filtrele bacteriologice, rezistenta la antibioticele care inhiba sinteza peretelui celular, sensibilitatea la presiune osmotica mare, tendinta de crestere si patrundere in profunzimea

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

mediului de cultura, incapacitatea de a se colora cu coloranti utilizati in mod obisnuit in bacteriologie, imposibilitatea de a fi observate la microscopul optic.

Multiplicare. Studii cinematografice (1973) au relevat faptul ca la aceeasi specie multiplicarea se poate face prin diviziune binara, inmugurire, fragmentarea filamentelor, rezultând elemente cocoide.

Metabolism. Micoplasmele sunt bacterii cu capacitati biosintetice limitate, care reflecta dimensiunile mici ale genomului si explica modul de viata parazitar (cu exceptia speciilor saprotrofe). Din acest motiv, necesita medii de cultura complexe care contin infuzie de extract de cord bovin (aport proteic), peptone, extract de drojdie (aport de vitamine din grupul B si acizi nucleici), ser sanguin (aport de colesterol si acizi grasi)., glucoza (pentru cele cu proprietati fermentative), arginina (pentru cele nefermentative), un sistem tampon, antibiotice (inhiba cresterea celorlalte bacterii si a microfungilor).

Caractere de cultura. Micoplasmele au o crestere lenta, astfel ca mediile insamântate necesita o perioada de incubare de ~ 15 zile. Pe mediu solid dezvolta colonii incrustate in geloza (datorita lipsei peretelui celular, bacteriile au tendinta de a patrunde in mediul de cultura, pentru a evita deshidratarea), cu aspect caracteristic de "ou ochi" (engl. *fried egg*), cu diametrul de 0,5 mm (fig.). In culturile de micoplasme dezvoltate pe mediu lichid se observa unde matasoase, filamente fragile sau mediul poate fi tulbure uniform.

Patogenitate. Micoplasmele sunt frecvent **parazite** ale omului si animalelor, infectia fiind favorizata de natura chimica a membranei plasmatice, care este similara cu cea a membranei celulei animale si astfel micoplasmele nu sunt recunoscute ca straine (*non - self*), fiind tolerate de catre sistemul imunitar al gazdei. Bacteriile adera la suprafata celulelor parazitate, la nivelul unor receptori specifici, fiind considerate **paraziti de suprafata** si se multiplica utlizând substantele adsorbite de membrana celulara. Acest aspect este important pentru patogenia lor, deoarece se realizeaza astfel o concentratie locala de metaboliti toxici (enzime hidrolazice-proteaze, lipaze), care degradeaza membrana celulei gazda. De asemenea, produc si elimina in mediu neuraminidaza (sialoglicopeptidaza), cu efect de modificare a incarcaturii electrice de suprafata a membranelor, de modificare a aderentei normale intre celule si a inhibitiei de contact.

Micoplasmele produc infectii ale cailor respiratorii si urogenitale. La om, anumite specii de micoplasme fac parte din microbiota normala a mucoaselor bucala (*M. orale, M. buccale, M. lipophilum, M. salivarium* - aceasta ultima specia are un rol, controversat, in

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

boala periodontala) si genitala (*M. genitalium, M. hominis, M. fermentans, M. penetrans*), iar altele sunt patogene.

Astfel, specia *M. pneumoniae* este recunoscuta unanim ca agent cauzal al pneumoniei atipice (o boala cronica), in sensul ca acest tip de pneumonie este cauzata de alt agent etiologic, decât cei bine cunoscuti in prezent a determina pneumonia, cum ar fi : agenti virali (virusul gripal, virusul respirator sincitial, adenovirusurile), bacterieni (*Chlamidia pneumoniae, Legionella pneumophila*), fungici (*Pneumocystis carinii*- microorganism considerat inainte protozoar si reincadrat taxonomic, pe baza analizelor genetice – vezi Cap. de Fungi patogeni). *M. pneumoniae* se transmite pe cale aerogena, prin intermediul picaturilor Pflugge, dar numai 3 - 10 % dintre cei contaminati se imbolnavesc de pneumonie atipica. Aproximativ o cincime dintre cei contaminati ramân purtatori sau manifesta simptome usoare de faringita, traheobronsita.

Specia *M. hominis* este agentul cauzal al unor uretrite, vaginite, cervicite si infectii neonatale. De asemenea, micoplasmele care determina infectii ale tractului genital pot fi responsabile de sterilitate la barbati si femei (in cazul infectiilor netratate), deoarece se cantoneaza in gâtul spermatozoidului (afectând mobilitatea acestuia) sau in ovul (care este sensibil la neuraminidaza).

Speciile *M. fermentans* si *M. penetrans* sunt agenti oportunisti izolati frecvent de la indivizii infectati cu virusul HIV.

Specia *Ureaplasma urealyticum* poate fi agentul cauzal al uretritei negonococice, al unor infectii ale tractului genital superior, ca si al unor infectii neonatale (infectii ale tractului respirator). Aceasta specie, ca si *M. hominis,* poate fi cauza unor infectii ale lichidului amniotic, ale avortului spontan, al mortii fatului, ca si al febrei *post-partum*.

Cercetari mai noi au aratat ca, datorita contactului intim intre membrana plasmatica a micoplasmelor cu cea a celulei gazda, se produce un schimb de antigene intre cele doua membrane, astfel ca antigene proprii organismului gazda, trecând pe membrana micoplasmelor, nu mai sunt recunoscute ca fiind proprii (*self*) si devin imunogene, determinând sinteza de autoanticorpi.

Micoplasmele sunt frecvent prezente in culturile de celule utilizate in virologie si in alte scopuri, in care produc modificari cromozomale care conduc la transformarea maligna.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Diagnosticul de laborator

- **diagnostic bacteriologic** (direct) - se bazeaza pe recoltarea de produse patologice (secretii ale mucoaselor infectate) si inocularea acestora pe medii de cultura solide si lichide. Dupa incubare, se examineaza caracterele de cultura. Pe medii solide examinate la microscopul optic cu un obiectiv uscat, se pot observa coloniile specifice, incrustate in geloza (in forma de « ou ochi »), care se pot colora. Metoda este utila identificarii speciei *M. hominis,* care formeaza colonii de ~ 300 nm in diametru, in aprox. 5 zile (are o crestere mai rapida) (fig. 44);
- teste biochimice : se utilizeaza medii speciale cu glucoza (pentru specia *M. fermentans*), arginina (pentru identificarea speciei *M. hominis*), cu uree (pentru identificarea speciei *U. urealyticum*) si adaos de rosu fenol ca indicator ;
- testul de hemadsorbtie (hematii de cobai) si testul reducerii unei sari de tetrazoliu (reducerea sarii incolore *triphenyl tetrazolium* la formazan de culoare rosie) sunt teste utile identificarii speciei *M. pneumoniae ;*
- sisteme microtest de identificare : Mycotrim RS (pentru identificarea *M. pneumoniae*) si Mycotrim Triphasic flask (pentru identificarea micoplasmelor specifice cailor genitale) ;
- **diagnosticul imunologic** (indirect) : prin metode imunoenzimatice calitative (de *screening*) si cantitative (tip ELISA);
- **metode genetice** (PCR) .

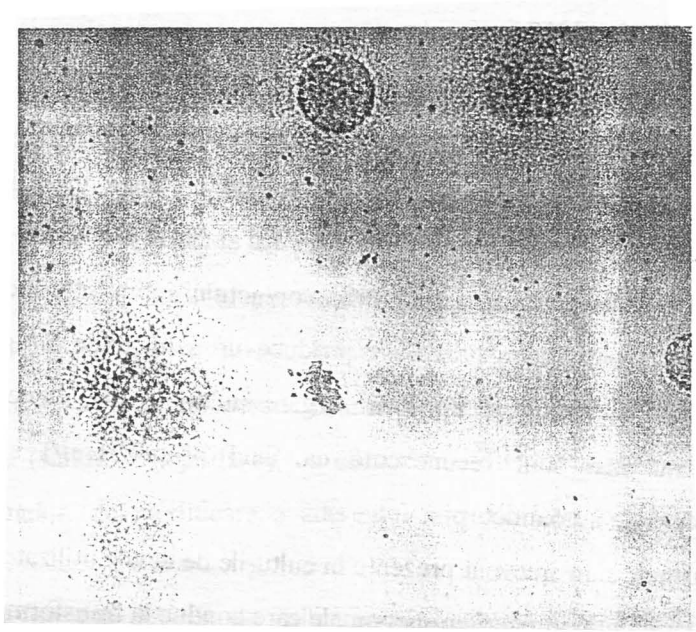


Fig. 44. *Mycoplasma hominis* in cultura: colonii cu aspect tipic de "ou-ochi" (marire: x 100).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Substante antibiotice. Fenomenul de rezistenta si multirezistenta la antibiotice

Antibioticele au fost considerate ca fiind cel mai important agent terapeutic descoperit in istoria medicinei, pentru ca au revolutionat net capacitatea clinicienilor de a tine in frâu moartea si boala cauzate de microorganismele patogene, ceea ce s-a intâmplat intr-un timp relativ scurt, mai exact in aproximativ o jumatate de secol, productia industriala a primului antibiotic descoperit (penicilina – Fleming, 1928) si utilizarea sa in terapie pe scara larga, incepând din 1943.

Capacitatea antibioticelor de a realiza vindecari rapide ale unor infecții care erau inainte fatale, a condus la considerarea lor ca „medicamente miraculoase„. Considerarea aceasta este valabila si in prezent si chiar daca dintr-un anume punct de vedere antibioticele si-au meritat renumele, acesta in mod paradoxal a creat si o anume bresa in „armura„ lor. Miracolele atribuite acestor medicamente, au condus la utilizarea lor incorecta si mai ales la o suprautilizare. Astfel, antibioticele au selectat tulpinile care aveau determinanti genetici de rezistenta la antibiotice si capacitatea naturala de a rezista la actiunea antibioticelor. Multi dintre acesti factori de rezistenta pot fi transferati si raspânditi de la un tip de bacterii rezistente, la alte bacterii, chiar apartinând la genuri si specii diferite. Acest rezultat negativ al utilizarii antibioticelor, un fenomen considerat un adevarat paradox, nu inseamna ca antibioticele au decazut sau ca nu mai pot fi utilizate, ci reflecta doar natura duala a efectelor puternice pe care le au si necesitatea utilizarii lor cu prudenta.

Antibioticele ramân in continuare foarte eficiente in tratarea majoritatii bolilor infectioase bacteriene. Situatia este nesigura totusi si in continua schimbare. Astfel, in multe parti ale lumii costul mic al antibioticelor din prima generatie si suprautilizarea lor fac ca acestea sa nu mai fie eficiente, datorita rezistentei pe care bacteriile au dobândit-o fata de acestea. Antibioticele de ultima generatie aparute pentru a combate bacteriile rezistente, sunt prea scumpe pentru a fi accesibile acestor tari in curs de dezvoltare, astfel ca antibioticele vechi continua sa fie utilizate in ciuda cresterii frecventei tulpinilor rezistente fata de acestea, ceea ce are ca efect propagarea fenomenului de rezistenta. In anumite regiuni, antibioticele sunt foarte putin utilizate datorita lipsei disponibilitatilor. Se poate spune deci ca utilizarea antibioticelor necesită imbunatatiri in toate partile lumii.

Antibioticele sunt inca medicamente foarte valoroase, o pretioasa resursa naturala, numai ca ar trebui mai bine inteles unde si când sunt folositoare. Pe de alta parte, antibioticele au

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

diferite utilizari care ar trebui schimbate si reduse. O imbunatatire a utilizării antibioticelor trebuie sa priveasca pe toti cei care utilizeaza aceste medicamente si anume, pe consumatori, pe cei care prescriu antibiotice (medici umani si veterinari, fitopatologi) ca si pe producatorii si distribuitorii lor. Prin recunoasterea diferitelor domenii in care utilizarea antibioticelor poate fi imbunatatita, se spera stimularea unei mai bune distributii si aplicari si o reducere a amenintarii reprezentate de fenomenul de rezistenta.

Rezistenta la antibiotice poate fi determinata, de actiunea unor determinanti genetici cromozomali, de segmente de ADN excedentare (transpozoni), integrate prin recombinare genetica. In majoritatea cazurilor insa, fenomenul este conditionat de prezenta plasmidelor R, de rezistenta si multirezistenta la antibiotice.

Bazele genetice ale rezistentei.

A. **Rezistenta mediata cromozomal** este datorata unei mutatii a genei care codifica fie tinta antibioticului, fie sistemul de transport la nivelul membranei, care controleaza patrunderea antibioticului. Frecventa mutatiilor spontane este de ordinul 10^{-7} – 10^{-9}, care este mult mai scazuta, comparativ cu frecventa dobândirii plasmidelor de rezistenta.

B. **Rezistenta mediata de plasmide.**

Plasmidele R sunt importante din punct de vedere clinic, din urmatoarele considerente:

- Sunt prezente la numeroase specii, dar mai ales la bacilii Gram - negativi.
- Determina adesea rezistenta multipla la antibiotice.
- Plasmidele au o mare rata de transfer de la o celula la alta, de obicei prin conjugare, fara bariere de gen si specie.

Mecanismele rezistentei la antibiotice. Exista patru mecanisme majore care mediaza rezistenta bacteriana la antibiotice (tabelul nr. 9): 1) Producerea de enzime care inactiveaza antibioticul; exemple: β-lactamazele inactiveaza penicilinele si cefalosporinele prin clivarea inelului β-lactam din structura acestor antibiotice; 2) Sinteza de catre bacterii a unor tinte modificate, asupra carora antibioticul nu are efect; exemple: o proteina ribozomala din subunitatea 30S determina rezistenta la streptomicina, iar ARNr 23 S metilat determina rezistenta la eritromicina. 3) Scaderea permeabilitatii membranei bacteriene, astfel ca o concentratie intracelulara eficienta a antibioticului nu mai poate fi atinsa; exemple: modificari ale porinelor pot reduce cantitatea de penicilina care patrunde in celula. 4) Eliminarea antibioticului de catre bacteria rezistenta cu ajutorul unei pompe "multidrug resistance", care importa protoni si elimina diverse molecule straine, cum ar fi antibioticele din familia quinolonelor.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabel nr. 9. Mecanismul de actiune al celor mai importante antibiotice antibacteriene si antifungice.

Mecanism de actiune	Antibiotice
Inhibarea sintezei peretelui celular	
Inhibarea formarii legaturilor incrucisate interpeptidice din structura peptidoglicanului	Peniciline (G, ampicilina), cefalosporine, imipenem, aztreonam,vancomicina
Inhibarea altor etape ale sintezei peptidoglicanului	Cicloserina, bacitracina
Inhibarea proteosintezei	
Actiune asupra subunitatii ribozomale 50S	Cloramfenicol, eritromicina, clindamicina
Actiune asupra subunitatii ribozomale 30S	Tetracicline si aminoglicozide (streptomicina, gentamicina, tobramicina, neomicina)
Inhibarea sintezei acizilor nucleici	
Inhibarea sintezei nucleotidelor	Sulfonamide, trimetoprim (biseptol)
Inhibarea sintezei ADN	Quinolone (ciprofloxacin, norfloxacin, acid nalidixic)
Inhibarea sintezei ARNm	Rifampin
Alterarea functiilor membranei celulare	
Activitate antibacteriana	Polimixine (colistin)
Activitate antifungica	Amfotericina B, nistatin, fluconazol, ketoconazol, Miconazol, clotrimazol
Alte mecanisme de actiune	
Diferite mecanisme	Izoniazida, metronidazol, griseofulvin, pentamidina

Rezistenta la antibiotice poate fi determinata si de schimbari care nu sunt la nivel genetic, care se pot datora:

- ❖ infectiilor strict localizate, cu bacterii prezente in colectii purulente delimitate de fibrina, la nivelul carora antibioticele nu pot patrunde, fiind absolut necesara interventia chirurgicala;
- ❖ starii de latenta a bacteriilor care nu cresc si astfel sunt insensibile la antibioticele inhibitorii ale sintezei peretelui celular, cum ar fi penicilinele si cefalosporinele; in mod similar, *M. tuberculosis* poate ramâne in stare dormanta in tesuturi pentru multi ani, timp in care nu este sensibil la antibiotice, dar poate intra din nou intr-un ciclu activ de multiplicare când apararea organismului gazda este deficitara, bacteriile fiind din nou sensibile la antibiotice, ceea ce dovedeste ca nu s-a produs nici o schimbare la nivel genetic;
- ❖ pierderii peretelui celular de catre bacteriile care in mod normal sunt sensibile la penicilina, care pot supravietui ca protoplasti, insensibili la antibioticele active pe peretele celular (daca bacteriile isi resintetizeaza peretele, redevin sensibile la penicilina);

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- ❖ aderentei bacteriilor la un substrat celular sau inert (biomateriale utilizate in medicina) generând un biofilm in care celulele bacteriene manifesta un comportament diferit comparativ cu celulele libere in suspensie (datorita modificarii exprimarii genelor), intre care si o *rezistenta fenotipica* la antibiotice;
- ❖ aparentei de rezistenta a bacteriilor (in infectii tratate cu doze insuficiente de antibiotice sau cu antibiotice care nu pot ajunge la focarul de infectie pentru ca, de ex., nu pot penetra bariera hematoencefalica).

Plasmidele R (de rezistenta infectioasa la antibiotice), descrise intial de Watanabe (1960), sunt elemente genetice extracromozomale, care confera celulei purtatoare rezistenta simultana la mai multe antibiotice, sulfamide etc. Factorii de rezistenta (plasmidele R) sunt molecule de ADN extracromozomal, dublu helical, circular, care poarta gene pentru o varietate de enzime care pot degrada antibiotice si pot modifica sistemele de transport transmembranar. In unele cazuri, numarul antibioticelor devenite ineficiente fata de o anumita bacterie este foarte mare, putând cuprinde antibioticele din clasa β-lactaminelor (peniciline si cefalosporine, naturale si semisintetice), din grupul aminazidelor (streptomicina, kanamicina, neomicina, gentamicina etc.), tetracicline, cloramfenicol si derivati ai acestuia, precum si sulfamide. O bacterie patogena care poarta o plasmida capabila sa confere rezistenta multipla la antibiotice prin mecanisme specifice, este foarte greu de combatut prin mijloace terapeutice traditionale.

Plasmidele R au o structura genetica complexa, fiind alcatuite din doua regiuni functionale, genetic distincte: 1) genele care asigura proprietatea de rezistenta la antibiotice (notate „r„ sau „det-r„) si 2) genele care confera functia de conjugon sau transferon, formând asa-numitul factor de transfer al rezistentei („FTR„), ce asigura capacitatea de replicare autonoma si de transfer sexual prin conjugare (fig. 45). O celula bacteriana poate purta mai multe gene de rezistenta, ceea ce-i poate conferi caracterul de multirezistenta sau super-rezistenta si chiar de rezistenta la toate antibioticele utilizate in mod curent. Genele de rezistenta la antibiotice de pe plasmidele R, pot fi considerate gene de virulenta, deoarece dobândirea rezistentei la agenti antibacterieni determina cresterea incidentei si raspândirea continua a infectiilor bacteriene.

Plasmidele R au fost evidentiate la membrii multor familii, genuri si specii (*Escherichia coli, Proteus sp., Salmonella sp., Shigella sp., Pseudomonas sp., Klebsiella sp., Erwinia sp., Serratia sp., Yersinia sp., Staphylococcus sp., Streptococcus sp., Clostridium sp., etc.)* (tabel nr.) dar au fost mult studiate in special la bacteriile intestinale, la care frecventa lor printre tulpinile izolate din anumite colectivitati este foarte mare, mai ales dupa folosirea antibioticelor in

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

terapeutica. Colonizarea intestinala cu tulpini rezistente de enterobacterii, poate avea loc si in absenta tratamentului cu antibiotice, ceea ce sugereaza ca tulpinile rezistente la antibiotice care au fost mult timp utilizate, pot deveni constituenti ai microbiotei intestinale normale a comunitatii, dobândite de catre aceasta din surse din mediu, inclusiv hrana.

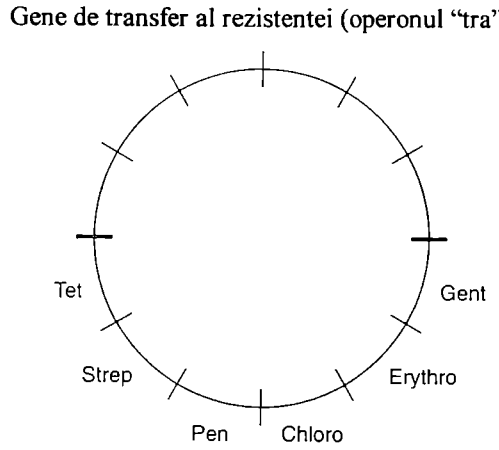


Fig. 45. Plasmid R - de rezistenta . Majoritatea plasmidelor de rezistenta au doua seturi de gene: 1) gene de transfer ala rezistentei care codifica pilii de sex si alte proteine care mediaza transferul plasmidelor prin conjugare si 2) gene de rezistenta la antibiotice care codifica proteine care determina rezistenta la antibiotice. Jumatatea din partea de jos a figurii ilustreaza, de la dreapta la stânga, genele care codifica rezistenta la tetraciclina, streptomicina, penicilina, cloramfenicol, eritromicina si gentamicina.

Tabel nr. 10. Bacteriile care prezinta fenomenul de rezistenta la antibiotice.

Tipul de bacterii	**Rezistenta la antibiotice semnificativa clin**
Coci Gram pozitivi	
Staphylococcus aureus	Penicilina G, nafcilin
Streptococcus pneumoniae	Penicilina G
Enterococcus faecalis	Penicilina G, aminoglicozide, vancomicina
Coci Gram negativi	
Neisseria gonorrhoeae	Penicilina G
Bacili Gram pozitivi	
-	
Bacili Gram negativi	
Haemophilus influenzae	Ampicilina
Pseudomonas aeruginosa	Antibiotice β-lactamice, aminoglicozide
Enterobacteriaceae	Antibiotice β-lactamice, aminoglicozide
Mycobacterii	
M. tuberculosis	Izoniazid, rifampin
M. avium- intracellulare	Izoniazid, rifampin s.a.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Rezistenta bacteriilor indusa de plasmide se realizeaza prin mecanisme biochimice diferite (tabel nr. 11), cum ar fi inactivarea antibioticului prin modificari enzimatice, blocarea transportului antibioticului in celula, modificarea structurala a „țintei„ antibioticului, utilizarea unei cai metabolice alternative celei perturbate de antibiotic. Prezenta plasmidelor R confera bacteriilor patogene proprietatea de a rezista la concentratii normal letale de antibiotic, creând mari dificultati in terapia infectiilor bacteriene. Situatia este agravata de posibilitatea transferului plasmidelor R de la bacteriile autohtone purtatoare, la bacteriile alohtone patogene, chiar daca apartin altor specii si genuri .

Tabel nr. 11. Mecanisme de rezistenta la antibiotice mediata de plasmide

Antibiotic	Mecanism de rezistenta
Peniciline si cefalosporine	Clivarea inelului β-lactamic de catre β-lactamaze
Aminoglicozide	Modificare prin acetilare, adenilare, fosforilare
Cloramfenicol	Modificare prin acetilare
Eritromicina	Schimbarea tintei prin metilarea ARNr
Tetraciclina	Reducerea patrunderii si cresterea eliminarii antibioticului
Sulfonamide	Eliminarea activa si reducerea afinitatii antibioticului pentru enzima tinta

Faptul ca membrii microbiotei intestinale normale (*E. coli, Proteus sp.*), poarta frecvent plasmide R, are si o alta semnificatie legata de caracterul unor bacterii de a fi conditionat patogene (oportuniste) putând determina infectii, uneori destul de severe la gazde compromise din punct de vedere imunologic.

Plasmidele R exista si in comunitati care nu au venit in contact cu substantele antibiotice, prezenta lor fiind explicata de diversi autori, ca având rolul de a proteja bacteriile producatoare fata de actiunea propriilor lor produsi sau de a proteja bacteriile din sol fata de actiunea antibioticelor eliminate de bacteriile producatoare in mediul extern. O alta explicatie care se da la ora actuala extinderii fenomenului de rezistenta la antibiotice este aceea ca antibioticele inseşi, insuficient purificate, ar contine fragmente de ADN care codifica aceasta proprietate, provenind de la tulpinile producatoare de antibiotice utilizate in industria farmaceutica. Frecventa rezistentei multiple la antibiotice a crescut de la 0,2% in 1958, la 58% in 1965, ajungând in prezent in unele medii spitalicesti la 93% pentru *E. coli* si 95% pentru *Proteus*. Cea mai frecventa este rezistenta la tetraciclina (95%), urmata de streptomicina, ampicilina, cloramfenicol si kanamicina. Importanta acestor date decurge si din faptul ca la om, *E. coli* reprezinta aprox. 80% din populatia bacteriana aeroba facultativ anaeroba din intestin.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Semnificativ este si faptul ca tulpinile rezistente nu ar avea nici un avantaj selectiv, daca antibioticele nu ar fi prezente. Paradoxal este ca antibioticele, chiar daca sunt cei mai buni agenti pentru tratarea infectiilor bacteriene, sunt in acelasi timp agentii care selecteaza si determina propagarea bacteriilor rezistente la antibiotice. Expertii in boli infectioase din SUA estimeaza ca in cel putin jumatate din cazuri, administrarea antibioticelor la om este nenecesara. Nivele similare sau mai mari de folosire necorespunzatoare a antibioticelor s-au gasit si in alte parti ale lumii, dar adevarata extindere a acestui fenomen in lume ramâne necunoscuta. Când folosirea necorespunzătoare inseamna o utilizare in exces, aceasta reprezinta o forta selectiva neterapeutica pentru propagarea tulpinilor rezistente la antibiotice. Studii comparative (de ex. SUA - Venezuela - China, 1990) demonstreaza o prevalenta a tulpinilor bacteriene rezistente in tarile dezvoltate, fata de cele in curs de dezvoltare. Un studiu comparativ realizat de catre colective din Franta si Jordania a demonstrat existenta unui mare numar de tulpini de enterobacterii rezistente la cloramfenicol, un antibiotic a carui utilizare a scazut mult in ultimul deceniu in tarile respective, ca si la noi in tara, datorita unor efecte secundare nedorite. Aceasta sugereaza ca determinantii de rezistenta pot persista in microbiota intestinala, chiar atunci când presiunea selectiva diminua, probabil datorita „ agregatelor de plasmide„ care codifica rezistenta la antibiotice.

Utilizarea antibioticelor ca agenti fitoterapeutici si pentru tratarea bolilor infectioase ale animalelor (mamifere, pasari, pesti, albine), face ca antibioticele sa fie dispersate in cantitati mari in mediul natural, având acelasi impact ecologic ca si in cazul uzului uman, respectiv selectia bacteriilor rezistente. Chiar daca aceste bacterii nu sunt infectioase pentru om, ele se adauga la fondul de gene de rezistenta din mediu, care pot fi transferate la alte specii si genuri de bacterii, inclusiv la cele patogene pentru om. Spre exemplu: speciile fitopatogene ale genului *Mycoplasma* (combatute cu tetraciclina, cloramfenicol, eritromicina) sunt foarte diferite de *Mycoplasma pneumoniae* care determina infectii respiratorii la om, dar pot face schimb de gene de rezistenta la antibiotice; speciile de *Erwinia* determina boli ale pomilor fructiferi, care se trateaza cu streptomicina, oxitetraciclina; acest gen face parte din fam. *Enterobacteriaceae* (care include *E.coli, Salmonella, Shigella),* bacteriile acestei familii putând schimba gene intre ele.

S-au facut studii care au demonstrat ca transferul de plasmide intre bacterii are loc intr-o varietate de habitate naturale: tractul gastro-intestinal al omului si animalelor (care reprezinta rezervorul principal de gene de rezistenta la antibiotice si locul de predilectie unde are loc transferul de gene, cum o dovedesc studiile pe soareci gnotobiotici), ape uzate, apa de mare, apa de râu, apa de lac, in sedimente, in sol, in rizosfera.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Un rol important in raspândirea rezistentei infectioase (plasmidiale) la antibiotice l-a avut, pe lângă utilizarea larga si nejustificata a acestora in profilaxia si terapeutica bolilor infectioase umane si animale, includerea lor in alimentatia animala (ca antibiotice furajere), cu scopul de a asigura cresterea animalelor tinere si de a ameliora starea lor generala si rezistenta la boli. Introducerea nutretului cu adaus de antibiotice (tetraciclină) in hrana animalelor intr-o ferma, este urmata in scurt timp de aparitia tulpinilor bacteriene rezistente in microbiota intestinala a animalelor, ca si in cea a personalului fermei.

Rezistenta la antibiotice nu poate fi constrânsa de granite locale sau nationale, de aceea confrunta intreaga lume. Incorecta utilizare (fie prin automedicatie, in spitale, in zootehnie, in agricultura) poate genera un factor de mediu aditional pentru selectarea si mentinerea tulpinilor bacteriene rezistente. Acestea sunt diseminate foarte repede, purtate de oameni, animale si produse alimentare de origine animala si vegetala. Infectiile umane cu bacterii rezistente la antibiotice fac tratamentul dificil prin limitarea spectrului de antibiotice utilizabile. Efectul dual al antibioticelor, atât benefic - antiinfectios, cât si negativ - de inducere a rezistentei, ca si usurinta cu care se pot raspândi tulpinile rezistente, trebuie sa determine utilizarea rationala a acestor medicamente si monitorizarea impactului lor asupra comunitatilor bacteriene.

Bacteriile Gram negative sunt considerate in general mai rezistente decât bacteriile Gram pozitive la agenti antimicrobieni. Plasmidele acestor bacterii (de exemplu: *E. coli*) confera rezistenta nu numai la antibiotice, ci si la metalele grele (de exemplu: ionii metalici din clorura mercurica). S-au facut studii care au demonstrat ca rezistenata la antibiotice si metale grele la tulpini de *E. coli* izolate de la om, din apa de râu, ape reziduale, alimente. Frecventa rezistentei la antibiotice si metale grele la tulpini de *E. coli* izolate din alimente reflecta gradul de contaminare a mediului cu aceste substante. Prin urmare, prezenta in probele de alimente a tulpinilor de *E. coli* multirezistente la antibiotice si metale grele reprezinta un potential risc de imbolnavire (*health hazard*) pentru consumatori.

Microbiologii sunt in prezent alertati de emergenta enterobacteriilor care prezinta rezistenta multipla la antibiotice. Unul din mecanismele prin care rezistenta poate aparea la tulpini anterior sensibile este transferul fara bariere de specie si gen al plasmidelor R, transfer ce se face cu multa usurinta in intestin unde densitatea populationala a enterobacteriilor este foarte mare. Bacteriile Gram negative enterice poseda in mod obisnuit o singura plasmida mare care codifica rezistenta la câteva antibiotice. De exemplu, la *K. pneumoniae* sunt prezente gene care codifica sinteza β-lactamazei, gene care codifica factori de virulenta pentru sideroforul

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

aerobactina si operonul cf29, care codifica o adezina nefimbriala CF29K (implicata in fenotipul difuz de aderenta), toate gasindu-se pe aceeasi plasmida conjugativa.

Enterococii (bacterii Gram pozitive incadrate inainte in genul *Streptococcus,* care apartin in prezent genului *Enterococcus sp.*) fac parte din microbiota intestinala. Inainte de identificarea tulpinilor de enterococi multirezistente la antibiotice la sfârsitul anilor '70, enterococii erau considerati bacterii relativ inofensive. Dupa doua decenii, enterococii au fost identificati ca agenti ai infectiilor nosocomiale, cu o frecventa in crestere si in paralel cu o dobândire a rezistentei la majoritatea substantelor antibiotice utilizate. Ca rezultat, enterococii au devenit agenti emergenti, cauza unor infectii dificil de tratat.

Emergenta enterococilor rezistenti la vancomicina a alarmat lumea medicala, din câteva motive: 1) dobândirea rezistentei la vancomicina de catre acesti agenti oportunisti, restrânge mult optiunile medicilor clinicieni pentru conducerea tratamentului infectiilor determinate de acestia; 2) experimentele de conjugare au confirmat transferul genelor de rezistenta la vancomicina, de la enterococi la *S. aureus;* 3) studiile epidemiologice din S.U.A. si Europa au identificat diferite presiuni selective care favorizeaza proliferarea si expansiunea populatiilor de enterococi rezistenti la vancomicina; 4) rezultatele modeste obtinute in ultimul deceniu in prevenirea si controlul strategiilor pentru limitarea rezistentei la vancomicina (ca si a rezistentei la meticilina la stafilococi), au reliefat dificultatea problemei, odata aparuta.

Studii recente au aratat ca alterarea starii de echilibru a microbiotei sub actiunea antibioticelor administrate irational, favorizeaza infectiile parazitare intestinale cu tulpini virulente (ex. *Giardia duodenalis, Hymenolepis nana*).

Studiul factorilor care determina aparitia si raspândirea rezistentei la antibiotice, cunoasterea determinantilor genetici ai rezistentei si a mecanismelor moleculare prin care pot fi eliminate plasmidele R din celulele bacteriene (fenomenul de vindecare), constituie obiective ale cercetarii microbiologice actuale, cu importanta practica si teoretica deosebita.

Metoda discurilor pentru determinarea sensibilitatii bacteriilor la antibiotice (vezi cap. Principii de diagnostic microbiologic) poate sa nu detecteze intotdeauna tulpinile rezistente, mai ales când se testeaza cefalosporinele, astfel ca se recomanda utilizarea metodei dilutiilor (fig.) si metoda E test (fig. 46). Detectarea tulpinilor rezistente este importanta pentru pacient, dar si pentru monitorizarea infectiilor nosocomiale si a fenomenului de rezistenta la antibiotice in ansamblu.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

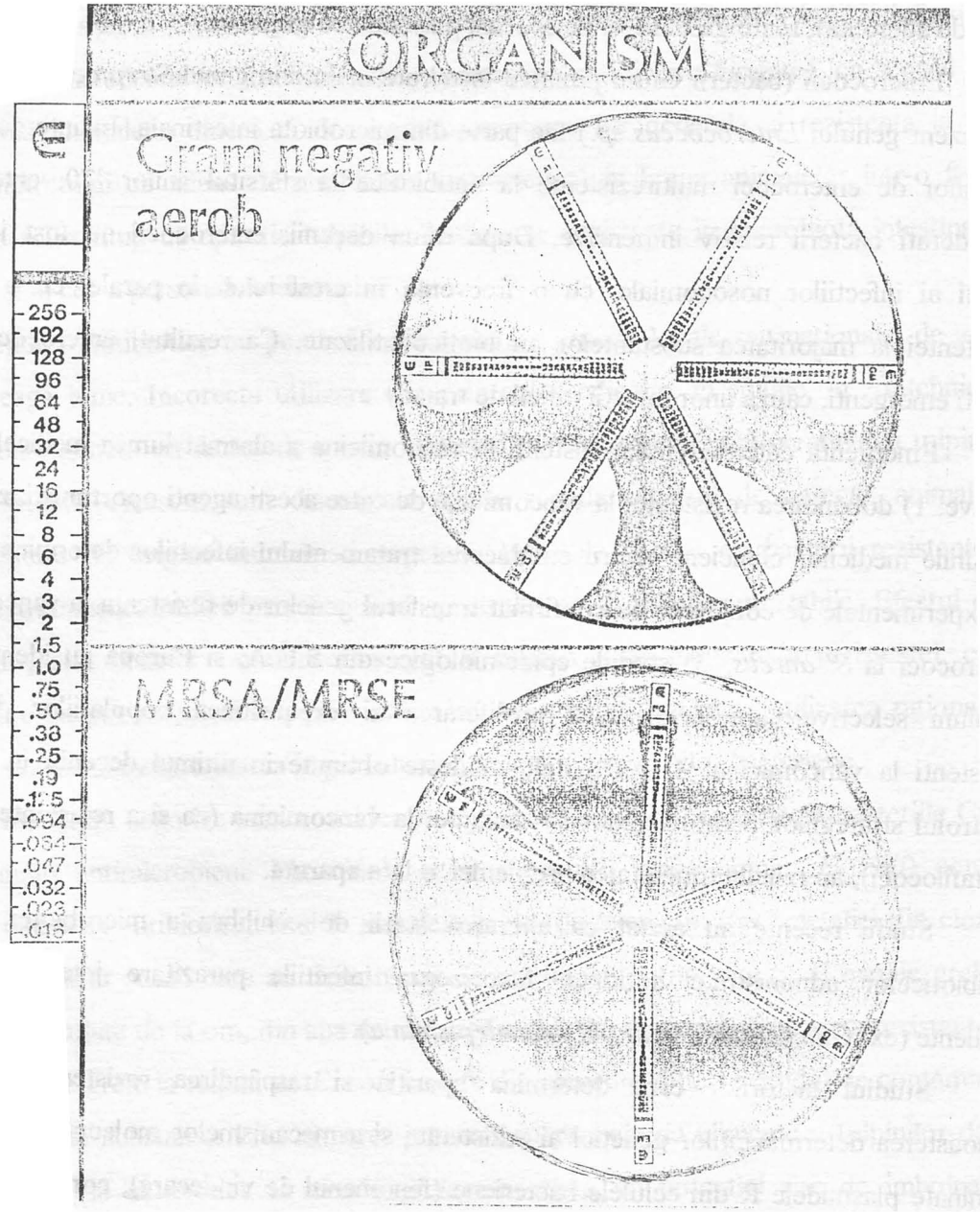


Fig. 46,a, b. Metoda E-test, care permite determinarea simultana a sensibilitatii unei tulpini bacteriene la un set de antibiotice si a concentratiei minime inhibitorii (C.M.I.) a antibioticelor active pe tulpina testata. Determinarea C.M.I. este posibila datorita faptului ca benzile de plastic neporos utilizate, contin de-a lungul lor antibiotice imobilizate (pe fata opusa scalei C.M.I. – in stânga imaginii), cu concentratii precise, care acopera 15 dilutii binare; când benzile sunt transferate pe mediul solid din placi, insamântat cu tulpina de testat, gradientul continuu de antibiotice va determina aparitia unor zone elipsoidale de inhibitie a cresterii tulpinii testate, iar valoarea C.M.I. se citeste acolo unde elipsa intersecteaza scala de valori C.M.I.

a) tulpina bacteriana Gram negativa sensibila la toate antibioticele setului ;
b) tulpina bacteriana Gram pozitiva (*Staphylococcusm sp.* meticilino-rezistent) plurirezistenta la antibiotice.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

O lunga perioada de timp microfungii au fost priviti ca agenti infectiosi nesemnificativi, iar laboratoarele clinice erau putin interesate in dezvoltarea serviciilor de micologie. In ultimii ani insa, literatura de specialitate a demonstrat un interes crescut reflectat in numarul mare al raportarilor de cazuri de infectii fungice.

Desi microfungii sunt recunoscuti in prezent ca o cauza importanta a infectiilor, marea majoritate a laboratoarelor ofera servicii minimale de micologie. Cauza nu este bine definita, o cauza posibila insa ar putea fi si programele educationale care au fost mai putine in acest domeniu, probabil datorita "mitului" ca micologia este greu de invatat. In prezent, numarul programele educationale care prezinta aspecte practice ale micologiei clinice, ca si al cartilor si publicatiilor stiintifice in acest domeniu a crescut, astfelca micologia a devenit mai accesibila laboratoarelor de microbiologie clinica si un component important al acestora.

Semnificatia medicala a fungilor. Exista mai mult de 50.000 - 100.000 de specii validate de fungi, dar numai 50 (dupa alti autori 75 sau 100) de specii sunt general recunoscute ca patogene pentru om. Aceste microorganisme eucariote au in mod normal o existenta saprotrofa in natura, in medii cu substante azotate in descompunere, fiind capabile insa si de un ciclu parazitic la om si animale. Infectiile generate de microfungi – *micoze,* nu sunt transmisibile in sensul comun al cuvântului, de la o persoana la alta, sau de la animale la om. Omul poate devini o gazda accidentala prin inhalarea sporilor sau prin patrunderea lor in tesutul traumatizat. Cu exceptia fungilor dimorfi, omul este in general rezistent la infectii fungice. Totusi, o alterare a functionalitatii sistemului imunitar al gazdei poate favoriza aparitia unor infectii cu fungi considerati in general nepatogeni. Astfel de infectii se pot produce la pacienti cu boli debilitante cum ar fi diabetul zaharat, leucemii si limfoame, in sindromul de imunodeficienta dobândita (SIDA) ca urmare a infectiei cu virusul HIV, ca si in supresia functiei imunitare instalata postcorticoterapie (medicamente antiinflamatoare administrate cu scopul evitarii fenomenului de respingere a grefelor, ca si in bolile autoimune). In ultimii ani a crescut foarte mult numarul infectiilor cauzate de fungi saprotrofi la pacienti imunocompromisi. Alti factori favorizanti includ alcoolismul si consumul de droguri, dar si o serie de proceduri medicale cum ar fi cateterizarea intravenoasa prelungita, interventii chirurgicale gastrointestinale, antibioterapia de lunga durata. In ultimul timp, in micologia medicala interesul s-a deplasat de la infectiile superficiale, dermatologice, la cele ale tesuturilor profunde, care pun grave probleme de diagnostic si tratament. S-a impus cu necesitate si dezvoltarea metodelor de testare a sensibilitatii

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

microfungilor la antibiotice, care trebuie sa ia in considerare o serie de particularitati ale microfungilor, cum ar fi cresterea miceliana, tendinta de formare de agregate si de aderenta la suprafata interna a tuburilor, care modifica sensibilitatea celulelor la antibiotice.

Fungi frecvent intâlniti in laboratoarele clinice . Din cele 50.000 – 100.000 de specii, mai putin de 100 au fost izolate din probele clinice. Intr-un laborator dat, foarte putine specii se intâlnesc foarte frecvent, fiind cunoscut faptul ca exista diferente in distributia geografica a anumitor fungi. Frecventa lor este dependenta si de tipul de proba biologica analizata. Astfel:

- din sânge sunt frecvent izolate speciile: *Candida albicans, C. tropicalis, C. parapsilosis, Cryptococcus neoformans, Histoplasma capsulatum, Candida lusitaniae, C. krusei, Saccharomyces sp., C. pseudotropicalis, C. zeylanoides, Trichosporon sp., Coccidioides immitis, Candida guilliermondii, Malasezzia (Pityrosporum) furfur;*
- din lichidul cefalorahidian se ioleaza speciile: *Cryptococcus neoformans, Candida albicans, C. parapsilosis, C tropicalis, Histoplasma capsulatum, Coccidioides immitis;*
- din tractul genitourinar se izoleaza speciile: *Candida albicans, C. glabrata, C. tropicalis, C. parapsilosis, Penicillium sp., C. krusei, Cryptococcus neoformans, Histoplasma capsulatum, Saccharomyces sp., Cladosporium sp., Aspergillus sp., Trichosporon sp., Alternaria sp.*
- din tractul respirator se izoleaza diferite specii de levuri, cu exceptia speciei *Cryptococcus neoformans* si numeroase specii de fungi filamentosi (mucegaiuri), cum ar fi: *Penicillium sp., Aspergillus fumigatus, A. flavus, A. niger, A. versicolor, Cladosporium sp., Geotrichum candidum, Fusarium sp., Trichosporon sp., Alternaria sp., Acremonium sp., Scopulariopsis;*
- de pe tegumente se izoleaza speciile: *Trichophyton rubrum, Alternaria, Candida albicans, Penicillium sp., Scopulariopsis, Epidermophyton sp., Candida parapsilosis, Aspergillus sp., A. versicolor, Acremonium sp., Cladosporium sp., Fusarium sp., Trichosporon sp.*

Infectii fungice.

Infectiile fungice, denumite generic **micoze**, se caracterizeaza printr-o simptomatologie atipica, nespecifica, care reduce sansele diagnosticului clinic. Bolnavii pot prezenta frecvent simptome cum ar fi: stare de subfebrilitate, transpiratii nocturne, scadere ponderala, moleseala, usoara fatigabilitate (oboseala), tuse, dureri de piept. Infectiile fungice cu localizare profunda sau

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

diseminate, pot mima alte infectii, cum ar fi TBC, bruceloza, sifilisul sau boli maligne diseminate. O atenta examinare a pielii si mucoaselor este obligatorie, pentru ca infectiile sistemice prezinta adesea si leziuni cutaneo-mucoase.

Anamneza poate contine date privitoare la o calatorie recenta intr-o regiune endemica pentru infectiile fungice, la o participare la activitati care fac ca pielea sa vina in contact direct cu animale infectate sau materiale contaminate, la posibilitatea inhalarii de spori fungici, date care trebuie luate in considerare.

A. Caractere generale si diagnosticul de laborator al infectiilor determinate de levuri (drojdii)

Levurile sunt microfungi a caror forma de existenta este unicelulara si care se multiplica asexuat prin inmugurire. Reprezinta un grup heterogen de microorganisme, incadrate atât in Cls. *Fungi imperfecti*, care se multiplica doar pe cale asexuata, cât si in *Cls. Ascomycetes*, care se multiplica asexuat si sexuat (prin ascospori formati in celule diferentiate – asce, rezultate din fuziunea a doua celule haploide **a** si α, apartinând la tipuri opuse de imperechere).

Exista in jur de 150 de specii de levuri ascosporogene clasificate in prezent in genul *Candida.* Dintre acestea, *C. albicans, C. tropicalis, C. glabrata* reprezinta mai mult de 80% din izolatele clinice de *Candida*, in timp ce altele sunt izolate sporadic si sunt considerate mai putin virulente. *C. albicans, C. parapsilosis, C. tropicalis si C. guilliermondii* pot determina infectii urinare, meningite si fungemie. Alte specii apar doar ca patogeni oportunisti; de exemplu, *C. lipolytica, C. krusei* pot fi asociate fungemiei. *C. lusitaniae* a fost recunoscuta recent ca un patogen important datorita rezistentei la amfotericina B. S-a raportat recent ca si alte genuri de levuri, considerate de obicei nepatogene, pot determina vulvovaginite, fungemie (*S. cerevisiae)* si endocardite (*Torulopsis sp.*). Genul *Torulopsis* – include levuri nefilamentoase, necapsulate cu inmuguriri multiple. Recent, pe baza rezultatelor analizelor genetice la nivel molecular, speciile acestui gen au fost incadrate in genul *Candida. C. glabrata* este un saprofit al pielii si mucoaselor, care determina in anumite conditii vaginite, infectii viscerale (renale), sistemice si septicemii. *C. albicans* ramâne insa levura cel mai frecvent izolata in clinica, fiind agentul etiologic cel mai comun, izolat din infectii severe ale mucoaselor, pielii si unghiilor.

Dintre **factorii de virulenta ai speciilor de *Candida*, aderenta** la suprafata celulei-gazda, **producerea de fosfolipaze, proteinaze** si **siderofori**, ca si **formarea de hife**, acesta din urma fiind factorul care ajuta la evaziunea levurii de mecanismele de aparare imuna ale gazdei.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Candida albicans. (denumiri anterioare : *Oidium albicans; Monilia albicans).*

Specia ***Candida albicans*** este o specie ubicvitara, fiind gasita pe plante, dar si ca un component al microbiotei normale a tractului digestiv, a tegumentelor si mucoaselor la om, frecvent izolata in clinica, fiind un patogen oportunist Ca toate levurile este acidofila, dezvoltându-se optim la un pH = 5 – 6,5, utilizeaza carbonul organic: glucide (testele de fermentatie si asimilatie sunt foarte utile identificarii – vezi Anexa VIII), alcooli, acizi, inulina; este keratolitica.

C. albicans este o ciuperca microscopica dimorfa, prezentând fazele de drojdie (celule unice) si miceliana (pseudomicelii si tuburi germinative), in functie de conditiile de mediu. Dimorfismul speciei *Candida albicans* suscita un interes deosebit, deoarece formarea hifelor este considerata a fi un proces cu semnificatie patologica. Diferentele in exprimarea antigenelor de suprafata, care se produc concomitent cu modificarile morfologice la nivelul peretelui celular, au un efect pronuntat asupra proprietatilor de aderenta la substrat si implicit asupra virulentei. Componentele de suprafata exprimate diferit la cele doua morfe, moduleaza relatia gazda-parazit, aderenta si invazia celulelor - gazda, semnalizarea celulara si interactiunea cu fagocitele. Astfel, in candidoze se pot observa celule levurice, pseudomicelii si tuburi germinative (fig. 47), care pot fi dificil de diferentiat de filamentele miceliene ale microfungilor dermatofiti. In sputa sau abcese subcutanate se pot evidentia elemente levuriforme. Aderenta la substratul celular poate fi urmata de invazie hifala si pseudohifala cu tulpini virulente de *C. albicans*, in timp ce colonizarea cu specii mai putin virulente poate fi limitata la straturile cheratinizate.

Colonizarea intestinului (considerat un organ la fel important ca multe alte organe pentru mentinerea homeostaziei organismului prin "efectul de bariera" al microbiotei intestinale) cu microorganisme exogene nu determina neaparat simptome de boala, mai ales daca gazda este imunocompetenta. Totusi, unele dintre aceste microorganisme sunt potential patogene mai ales daca gazda este imunosupresata. In plus, pentru a preveni colonizarea cu microorganisme exogene, un rol secundar al efectului de bariera este acela de a mentine microorganismele endogene in numar mic, mai ales a acelora care, desi intotdeauna prezente in microbiota normala a subiectilor sanatosi, pot deveni patogene daca numarul lor creste. Un astfel de **patogen "oportunist" este si specia *C. albicans*.**

S-a demonstrat, mai ales pe modele experimentale, ca efectul de bariera poate fi influentat de diferiti factori cum ar fi dieta, stresul psihologic, dar si de tratamentele

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

antimicrobiene care determina multiplicarea microorganismelor rezistente si emergenta celor potential patogene, pâna atunci mentinute intr-o stare de echilibru (eubioza), de relatiile cu

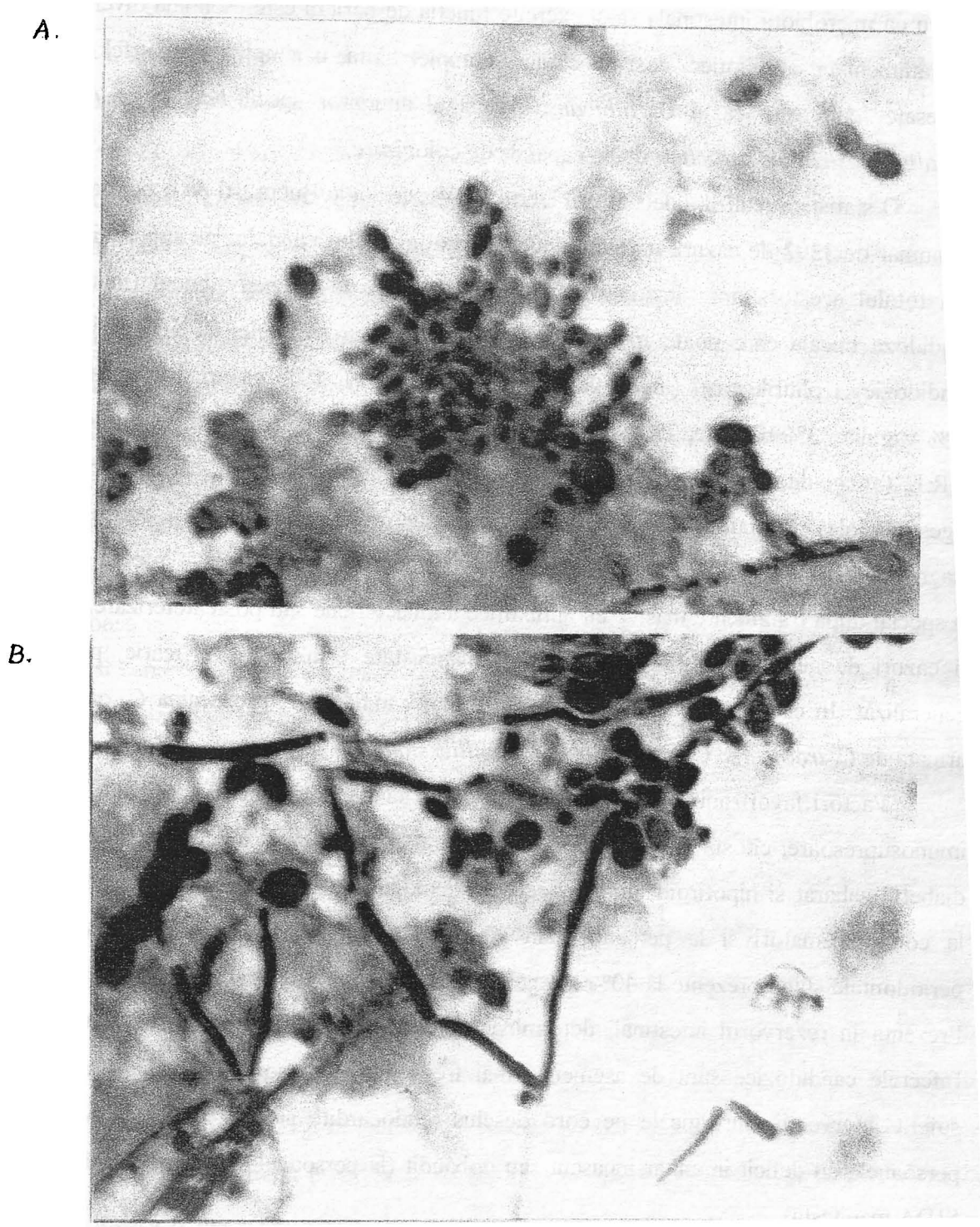


Fig. 47, A si B. Imagini de microscopie optica ale unor frotiuri efectuate din secretie vaginala, dintr-o infectie candidozica (*C. albicans*); A) – celule inmugurite si pseudohife rezultate prin inmuguriri repetate, neurmate de separarea celulelor levurice ; B) celule levurice tipice si tuburi germinative (marire : x 2500).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

speciile asociate, « ecosistemul » respectiv evoluând spre starea de dezechilibru (disbioza). Pentru ca microbiota intestinala sa-si exercite functia de bariera este esentiala diversitatea sa, ori un tratament cu antibiotice, desi nu elimina complet biota, o simplifica si astfel specii normal supresate, cum este cazul *C. albicans*, dar si al anumitor specii *bacteriene (Enterococcus faecalis, Clostridium difficile*), devin capabile de colonizare.

O statistica realizata de Centrul Dermato-Venerologic Bucuresti pe o perioada de 5 ani si un numar de 3392 de cazuri, a aratat o incidenta a infectiilor candidozice superficiale de 26.5%. Din totalul acestora aproximativ 41 % au fost cazuri de *muguet* bucal (margaritarel) sau candidoza bucala care poate interesa mucoasa, limba sau faringele, 21% cazuri de intertrigo candidozic la pliurile mari (inghinale, submamare, axilare), 19% cazuri de onixis si perionixis, 13% vaginite, 3% balanite, 2% perles comisural si 1% otomicoze. Infectii viscerale: in domeniul O.R.L. (amigdalite, laringite, sinuzite, otomicoze), oculare, respiratorii, cardiovasculare, urinare, digestive, ale sistemului nervos central (meningite, abcese cerebrale si medulare, al caror diagnostic este foarte dificil; infectii generalizate – fungemie, septicemie – infectii grave, aparute in special dupa tratamente masive cu antibiotice antibacteriene sau postcateterizare. S-au raportat si cazuri de alergii la antigene candidiale, manifestate prin colita, urticarie, prurit anal sau generalizat. In ceea ce priveste etiologia infectiilor candidozice, predomina *C. albicans* (80%), urmata de *C. tropicalis, C. parapsilosis, C. guilliermondii.*

Factori favorizanti ai infectiilor candidozice sunt medicamentele antipaludice de sinteza, imunosupresoare, citostatice, psihotrope, ca si anticonceptionalele, afectiuni endocrine, cum ar fi diabetul zaharat si hipotiroidismul, cancerul si hemopatiile. Astfel de infectii sunt mai frecvente la copiii prematuri si la persoanele in vârsta, la persoanele cu carii dentare si inflamatii periodontale (fiind prezente la 40% din persoanele purtatoare de proteza), cu amigdalita cronica. Prezenta in rezervorul intestinal, determina o frecventa mai mare a infectiilor vulvo-vaginale. Infectiile candidozice sunt de asemenea mai frecvente la persoanele iradiate, la cele care au suferit interventii chirurgicale pe cord deschis (endocardite si septicemii), la narcomani si la persoanele cu deficit imunitar innascut sau dobândit (la persoanele infectate cu HIV si cu boala SIDA manifesta).

Astfel, la pacientii cu *AIDS,* candidozele orofaringiene (infectii secundare, oportuniste) sunt frecvente, fiind semnalate la la 50% dintre subiectii infectati cu HIV si la 90% dintre pacientii cu *AIDS.* Situsurile principale ale infectiei bolnavilor candidemici sunt plamânul, cateterele, epiteliul urinar sau numai tubul digestiv. Cazurile de candidemie survin adesea si la

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

bolnavii cu leucemii si carcinom orofaringian. Factorii de risc in aparitia candidemiei sunt prezenta unui cateter central, neutropenia, colonizarea intestinala cu levuri. Datorita mortalitatii ridicate (95%) a cazurilor de candidoze sistemice si dificultatii de diagnosticare prin hemoculturi sau biopsii, s-a incercat punerea la punct a unor metode de detectare a antigenelor de *Candida,* a anticorpilor sau a unor metaboliti fungici in serul pacientilor.

C. krusei este o specie descrisa la om ca un microorganism de tranzitie, izolat relativ rar de pe mucoase si cu o semnificatie clinica minora. Recent, a devenit un patogen emergent notabil, cu un spectru larg de manifestari clinice care cuprinde fungemie, endoftalmita, artrita si endocardita, majoritatea infectiilor având transmitere nosocomiala si incidenta crescuta la pacientii imunocompromisi. Frecventa mare a cazurilor de *AIDS* si utilizarea pe scara larga a noului antimicotic triafol-fluconazol in infectiile fungice la acesti pacienti, au contribuit la o crestere semnificativa a incidentei infectiilor cu *C. krusei,* datorita rezistentei levurii la acest medicament, chiar daca aceasta specie este mai putin virulenta decât *C. albicans* in termenii capacitatii sale de aderenta, potentialului proteolitic si producerii de fosfolipaze.

Cryptococcus neoformans este o levura prezenta in sol, de unde poate ajunge pe fructele zemoase si in lapte, pe pielea omului sanatos, in materiile fecale, ca si in excrementele porumbeilor si canarilor. Nu se transmite de la persoana la persoana sau de la animal la animal. Se transmite pe cale respiratorie, cutanata sau digestiva.

Infectia cu *HIV* poate constitui conditia predispozanta si pentru infectia cu aceasta levura saprotrofa, dar care inhalata poate produce infectii fatale. *Cryptococcus neoformans* este o bazidiomiceta capsulata care creste in faza haploida, dar in conditii favorabile celulelor tipurilor opuse de imperechere produce o teleomorfa denumita genul *Fillobasidiella.* Crioptococoza este generata de inhalarea celulelor de levuri sau de bazidiospori din mediu. La majoritatea indivizilor infectia ramâne localizata in plamân, dar levura poate fi diseminata determinând meningita criptococala, cel mai adesea la pacientii imunocompromisi (80 – 90 % din infectiile criptococale sunt intâlnite la pacientii cu *HIV*). Factorul de virulenta cel mai important este **stratul capsular gros** (fig 48) al carui constituent primar este un polizaharid numit **glucuronoxilomanan (GXM)** care confera levurii o mare capacitate de adeziune si o actiune antifagocitara puternica. Acest polizaharid este unul dintre cei mai puternici activatori cunoscuti ai sistemului complement, atât pe calea alternativa, cât si pe calea clasica (dupa legarea anticorpilor specifici) si determina si cea mai serioasa complicatie a criptococozei la pacientii cu *AIDS,* respectiv cresterea presiunii

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

intracraniene determinata de vâscozitatea extraordinara a solutiei de polizaharid criptococal si de aparitia unor dopuri vâscoase de polizaharid si celule capsulate care pot bloca drenajul limfatic.

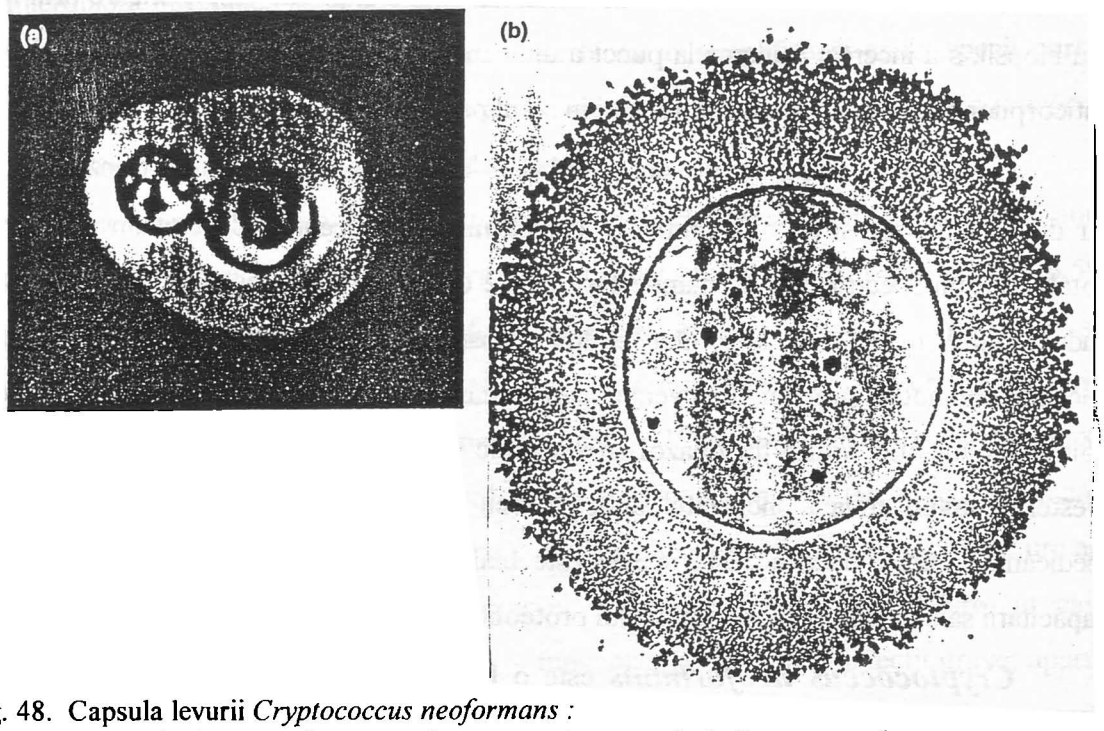


Fig. 48. Capsula levurii *Cryptococcus neoformans* :
(a) Celule de *C. neoformans* colorate negativ cu tus de India, cu capsula groasa ;
(b) Imagine la M.E.T. aratând localizarea fragmentului C3 legate de capsula levurii ; situsurile de legare a C3 au fost vizualizate prin colorarea cu imunoperoxidaza a ce lulelor preincubate cu ser uman.

Aderenta levurilor la suprafete inerte. Semnificatie medicala.

Importanta medicala a acestui proces este legata in special de utilizarea in medicina, in diferite scopuri, a biomaterialelor (materiale plastice polimerice, aliaje metalice). Gristina (1987) considera ca aproape orice om in societatile avansate din punct de vedere tehnologic este gazda pentru biomateriale, utilizate pentru substituirea permanenta sau temporara a tesuturilor, sub forma de implanturi dentare, proteze articulare, valvule cardiace, lentile de contact, plase si suturi, diferite tipuri de catetere. Comparativ cu studiile privind aderenta levurilor la alte suprafete inerte, relativ putine cercetari au fost intreprinse asupra aderentei levurilor apartinând genului *Candida* la suprafete de plastic, in ciuda potentialului de relevanta al acestei aderente pentru stomatitele dentare, ca si pentru infectiile dezvoltate pe materialele protetice de plastic si pe cateterele intravasculare si urinare.

Candidoza cronica atrofica este o complicatie comuna la purtatorii de proteza mai in vârsta, vârstnici, la care incidenta poate fi mai mare de 60%. Este o forma de candidoza bucala,

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

in care suprafata danturii acrilice actioneaza ca un rezervor de infectie. Aderenta *in vitro* la acrilat, ca si la celulele epiteliale bucale, este favorizata de cresterea levurii aflata in faza stationara de crestere in medii de cultura care contin mari concentratii de zaharuri ca sursa de carbon. Cresterea adeziunii levurii este corelata cu producerea unui strat fibrilar de suprafata, cu caracteristicile tinctoriale ale unui polizaharid anionic. S-a constatat ca pacientii cu candidoza cronica au o dieta in general bogata in glucide, iar dupa consumul de dulciuri, concentratia bucala de zaharoza a fost gasita mai mare de 600 mM. Celulele aflate in faza exponentiala de crestere sunt slab aderente la acrilat, ceea ce indica faptul ca acestor celule le lipseste stratul adeziv. Cationii divalenti si serul sanguin, favorizeaza adeziunea la acrilat; de exemplu, traumele palatale determina adsobtia componentelor serice la suprafata coroanelor dentare si pot fi un factor care initiaza colonizarea danturilor *in vivo*. Saliva, clorhexidina si *Streptococcus salivarius* sunt inhibitori.

Aderenta speciilor de *Candida* la suprafetele de plastic este implicata si in patogenia candidemiilor de cateter. Microscopia electronica de baleiaj a cateterelor infectate in mod natural, a relevat straturi de *Candida* aderenta si un material fibrin-*like*; factorii care initiaza colonizarea persistenta includ depunerea de fibrina si scaderea activitatii microbicide a fagocitelor in micromediul corpului strain. S-a testat capacitatea de aderenta a doua specii de levuri, *C. albicans si C. tropicalis,* fata de materialele plastice din care se confectioneaza cateterele si fata de materialele acrilice, observându-se ca specia *C. tropicalis* are o capacitate de aderare, fapt explicat prin hidrofobicitatea de suprafata, mai mare in cazul acestei specii, corelata cu continutul in acizi grasi, legati covalent de manoproteinele stratului fibrilar de suprafata.

Mai recent, s-a demonstrat ca si specia *C. krusei* are un potential semnificativ mai mare de a forma biofilme decât *C. albicans*, pe cateterele de policloruraa de vinil, afinitatea mai mare pentru suprafetele de plastic fiind explicata tot in termenii hidrofobicitatii (de 5 ori mai mare a celulelor de *C. krusei*, comparativ cu *C. albicans)* ca si ai influentelor nutritionale.

Aspectul acesta, al formarii biofilmelor intr-un « ecosistem » medical este demn de semnalat, datorita faptului ca microorganismele sunt rezistente la dozele terapeutice uzuale de antibiotice, determinând infectii cronice, dificil de tratat si cum pacientii la care survin sunt adesea intr-o stare de imunosupresie, evolueaza spre "exitus"; dupa unii autori, mortalitatea cazurilor de candidoze diseminate este de 95%.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

In ultimul timp, levurile au fost studiate si sub un alt aspect, acela al relatiilor lor antagonice cu specii patogene *in vivo*, relatii ce ar putea fi exploatate prin utilizarea de preparate probiotice, in scopul prevenirii sau tratarii unor infectii, prin alte mijloace decât antibioticele, considerate la ora actuala un "paradox", pentru ca utilizarea lor prezinta mai multe neajunsuri, decât avantajele cunoscute Astfel, s-a descris existenta unui fenomen de antagonism microbian *in vivo* exercitat de catre *Saccharomyces boulardii* fata de diferite tulpini de *Candida,* in tractul digestiv al sobolanilor gnotoxenici. Acest efect antagonic, preventiv si curativ, prezinta o anumita specificitate, fiind activ contra *C. albicans, C. krusei, C. pseudotropicalis* si inactiv fata de *C. tropicalis.* Acest efect dispare daca celulele de *S. boulardii* sunt omorâte prin incalzire. Procesul a fost descris ca "primul exemplu al unui fenomen de antagonism microbian exercitat *in vivo* de catre microorganisme care nu fac parte integranta din ecosistemul tubului digestiv, dar pe care il tranziteaza in numar ridicat , fara a pierde viabilitatea". Cinetica eliminarii intestinale a levurii *S. boulardii* a fost studiata si la voluntari, artându-se ca drojdia inhiba cresterea a numeroase microorganisme, determina cresterea efectului de bariera fata de *Candida sp.*, reduce mortalitatea indusa de *Clostridium difficile* la rozatoarele infectate experimental (Pecquet si colab., 1991) si previne diareea acuta si cronica determinate de tulpinile de *E. coli* enteropatogene , fara a fi eficienta insa fata de tulpinile enterotoxigenice (McFarland, 1993). De fapt, acest adevarat agent farmacologic (mai curând decât un agent de manipulare ecologica) a fost descoperit prin investigarea unui remediu popular impotriva diareei, folosit in Indochina ; in prezent este folosit in profilaxia si prevenirea recaderii colitei membranoase determinata de *C. difficile. S boulardii* nu se implanteaza, dar supravietuieste in numar mare pasajului si fara a afecta marimea populatiei de *C. difficile*, leaga exotoxina produsa de acesta si o cliveaza cu o proteaza preformata. Pentru prevenirea infectiilor post antibioterapie se studiaza si posibilitatea administrarii unor tulpini izolate din materiile fecale, dar exista o dificultate legata de mentinerea viabilitatii acestora in produsele comerciale.

Diagnosticul de laborator al infectiilor determinate de levuri.

Testele de laborator indica un raspuns inflamator nespecific: viteza de sedimentare a sângelui (VSH) este crescuta, leucograma indica neutrofilie si monocitoza moderate. Biopsiile au un rol important in diagnosticul rapid, mai ales al infectiilor subcutanate.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Cultivarea levurilor se face pe mediu Sabouraud sau Y.P.G (vezi Anexa IX). Semnificatia prezentei celulelor de *Candida* in culturi este diferita, in functie de produsul patologic din care s-a facut insamântarea. Astfel, daca insamântarea s-a facut din sânge, urina, lichid cefalorahidian, focare inflamatorii inchise, prezenta levurilor are o semnificatie patologica. In interpretarea prezentei acestora pe mucoase si tegumente (unde pot exista in stare saprotrofa) se tine cont de specie si de abundenta elementelor. Prezenta exclusiva sau preponderenta a celulelor de *Candida* are semnificatie patologica. Specia *Candida albicans* este **un comensal al mucoaselor** (la om si animale), dar **prezenta sa in leziuni cutanate are semnificatie patologica**. Prezenta la persoanele sanatoase este in proportie de 7,5% in cavitatea bucala, de 15% in materiile fecale, de 5 – 15% in vagin la femeile negravide si de 32 – 34% la femeile gravide. Pe tegumente pot fi prezente si speciile *C. krusei, C. parakrusei.* Specii cum ar fi *C. krusei, C. tropicalis, C. guilliermondii* pot fi prezente in natura, iar *C. tropicalis, C. lipolytica, C. robusta* pot fi evidentiate in produsele lactate.

Recoltarea probelor patologice.

Pentru a face un diagnostic corect al micozelor, de mare insemnatate este modul de recoltare a probelor patologice, deoarece levurile nu au o raspândire egala in leziunile cutanate. In infectia numita *intertrigo candidozic*, caracterizata prin leziuni cutanate izolate sau confluate in placi zemuinde, recoltarea scuamelor din leziuni se face prin raclarea cu marginile unei lame slefuite, de la marginea leziunilor. In infectiile unghiilor numite *onixis* si *perionixis*, recoltarea se face de la extremitatea proximala a unghiei (unde este subtiata, dezlipita, deformata), din depozitul verzui-brun, ca si din tesutul periungheal inflamat. Exudatele si secretiile mucoaselor se recolteaza cu tamponul de vata steril sau cu ansa. Daca exista, se poate preleva din depozitul albicios-cremos si pseudomembrane, care trebuie examinate extemporaneu si insamântate pe diferite medii. Expectoratia se recolteaza, de preferinta, prin spalatura bronsica, dupa spalarea cavitatii bucale cu ceai de musetel, solutie de hipermanganat de potasiu (1 °/ooo), rivanol (1%) sau alt antiseptic. Materiile fecale se recolteaza in coprorecoltoare, pe o solutie de penicilina / streptomicina in apa fiziologica sterila, pentru a inhiba cresterea bacteriilor. Puroiul din leziunile inchise se recolteaza prin punctie aseptica. Pentru disocierea produsului de examinat se folosesc solutii de Na_2S – 10% (actioneaza la rece si realizeaza o clarificare rapida), sau de KOH – 40% (actioneaza la cald, dar trebuie evitata fierberea amestecului).

Prelucrarea probelor in laborator in scopul identificarii microfungilor se face la fel ca si in cazul bacteriilor: examen microscopic direct al preparatelor proaspete L/l, al frotiurilor colorate (au caracter de Gram pozitive), cultivare pe medii de izolare si cultivare (Sabouraud),

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

urmata de examinarea caracterelor de cultura si morfologice, determinarea capacitatii de formare de tuburi germinative (prin metoda culturilor intre lame imersate in mediu de cultura, insamântat in striuri si acoperit cu lamela – vezi p. 127) ca si pe medii speciale pentru identificarea biochimica (teste de fermentatie si asimilatie – vezi Anexa VIII) ; sunt disponibile si galerii miniaturizate (microtest) tip API : API Candida si API 20 C AUX, cu perioada de incubare de 18 - 24 ore si respectiv, 24 – 48 ore. Este util si diagnosticul imunologic, prin teste serologice clasice sau teste rapide de latex –aglutinare. In final, se recomanda intocmirea unor rapoarte de caz detaliate, mai ales ale celor complicate.

Cryptococcus neoformans se evidentiaza pe preparate microscopice sub forma de celule rotunde, capsulate, care prezinta inmugurire multipolara; prezenta lor in numar foarte mare este semnificativa si mai ales daca recoltarea s-a facut prin bronhoscopie, altfel este considerata intâmplatoare. Evidentierea in bila, urina, materii fecale se face numai prin cultivare (mai rar prin examen microscopic). Se utilizeaza mai putin preparate colorate; la coloratia Gram, ca toate levurile, are caracter Gram pozitiv.

Alte specii de levuri patogene. ***Coccidioides imitis***. Face parte dintre fungii dimorfi, care exista in forma filamentoasa in sol si ca sferule in tesuturi. Filamentele formeaza artrospori usori, diseminati cu ajutorul vântului (fig. 49).

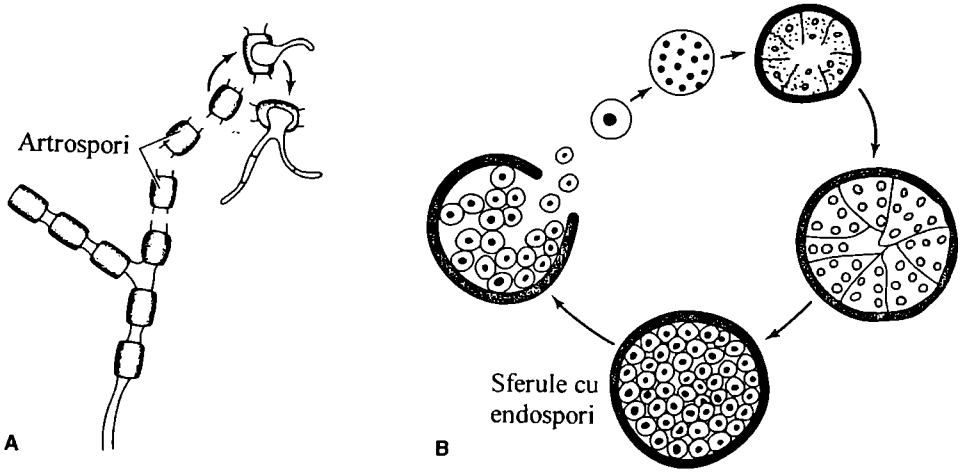


Fig. 49. Stadii de existenta ale speciei *Coccidioides immitis*. A. Artrospori formati la capetele hifelor in sol. Prin germinare in sol se formeaza noi hife ; daca sunt inhalati, artrosporii se diferentiaza in sferule. B. Endospori formati in sferule, la nivelul tesuturilor : la ruperea sferulelor, endosporii disemineaza si formeaza noi sferule.

Patogenie. Artrosporii inhalati, in plamâni formeaza sferule cu ϕ = 30 µm, cu perete celular gros, care sunt pline cu endospori. Dupa ruperea peretelui celular, endosporii sunt eliberati si se diferentiaza in noi sferule. Organismul poate fi invadat din aproape in aproape sau pe cale sanguina, infectia fiind denumita coccidiomicoza. Leziunile granulomatoase apar mai ales in

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

maduva osoasa si in sistemul nervos central (meninge). Diseminarea din plamân in alte organe se produce la persoane cu deficit al imunitatii mediate celular. Majoritatea persoanelor infectate (75%) sunt asimptomatice si dezvolta o reactie de hipersensibilitate intârziata, care limiteaza cresterea microorganismului. I.D.R. (+) la antigenul specific – *coccidioidina*, indica un prognostic bun (raspunsul imun mediat celular este eficient, limitând infectia). Boala se manifesta prin urmatoarele simptome: febra, astenie, anorexie, cefalee nocturna, modificari radiologice, leziunile pulmonare fiind asemanatoare cu cele din TBC.

Histoplasma capsulatum, este inclusa in Cls. *Fungi imperfecti*, cu multiplicare asexuata. Face parte din grupul fungilor dimorfi, cu o faza filamentoasa prezenta in sol si faza de drojdie in tesuturile infectate. Formeaza doua tipuri de spori asexuati: *macroconidii* – tuberculiforme, cu perete celular gros si proiectii digitiforme, importante pentru identificarea de laborator si *microconidii* – mai mici, cu perete celular subtire, neted, care daca sunt inhalati transmit infectia (fig. 50).

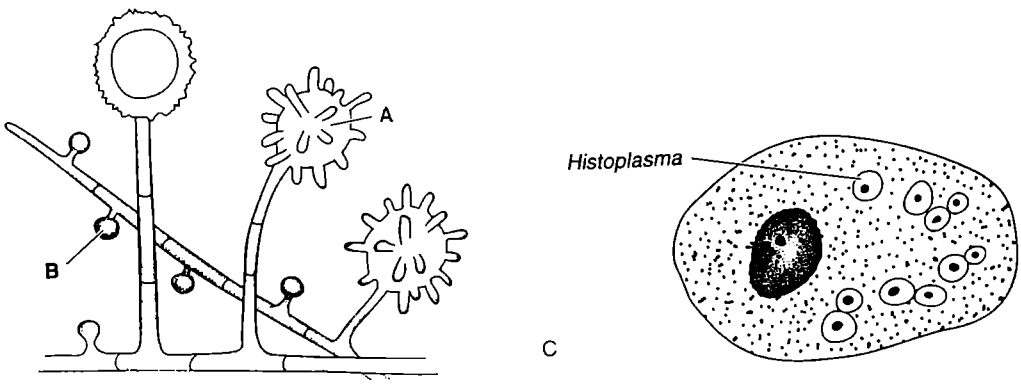


Fig. 50. A, B, C. Stadii de existenta ale speciei *Histoplasma capsulatum* : A si B - spori asexuati: macroconidii tuberculiforme (A) si microconidii (B); C- stadiul levuriform – celule localizate intr-un macrofag.

Transmitere. Sunt fungi raspânditi in multe parti ale lumii, in sol, zona endemica fiind siuata in estul S.U.A. Agentul patogen este prezent mai ales in solul puternic contaminat cu excremente de pasari sau lilieci (guano) infectate. Numarul de infectii la om creste când se fac excavatii (pentru constructii) ale solului contaminat.

Patogenie. Sporii inhalati sunt fagocitati de catre macrofage si evolueaza la forma de drojdie. Se raspândesc repede in corp, mai ales in ficat si splina, dar majoritatea infectiilor sunt asimptomatice. La o expunere intensa (cotete de pasari, pesteri cu lilieci) pneumonia devine manifesta. Forme de histoplasmoza diseminata severa apar la copii si indivizi cu imunitate celulara redusa, iar ulceratiile limbii sunt tipice pentru histoplasmoza diseminata la pacientii cu SIDA.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Diagnosticul de laborator. In biopsiile de maduva osoasa pot fi observate celule de drojdii in macrofage. Cultivarea pe mediu Sabouraud permite observarea de hife cu macroconidii. Diagnosticul histoplasmozei se mai poate face prin radioimunodozare (RIA), metode genetice si metode serologice: reactia de fixare a complementului RFC (titru semnificativ 1/32), imunodifuzie (metoda mai specifica, dar mai putin sensibila). Rezultatul acestor teste poate fi fals (+), datorita reactiilor imunologice incrucisate cu *Blastomyces* sp. Deoarece testele de evidentiere a anticorpilor pot fi negative, evidentierea antigenelor specifice in urina este un test util diagnosticarii histoplasmozei diseminate la pacientii imunocompromisi. Intradermoreactia (I.D.R.) pozitiva cu histoplasmina se caracterizeaza printr-o induratie cu ϕ = 5mm, la 2-3 saptamâni dupa infectie. Reactia ramâne pozitiva ani de zile. Testul este util mai mult studiilor epidemiologice si mai putin diagnosticului. Infectiile asimptomatice nu se trateaza. Leziunile pulmonare se trateaza cu amfotericina B, iar formele meningeale cu fluconazol. Prevenirea se face doar prin evitarea expunerii.

Pityrosporum sp. – *specii de* levuri lipofile, cu inmugurire polara de forma ovala sau de butelie; nu fermenteaza zaharurile. *Malassezia furfur(*denumirea actuala*)* – este agentul patogen al micozei numita =*tinea versicolor* ="pitiriasis versicolor" , care determina depigmentarea pielii, mai ales in sezonul cald si umed (se trateaza local, cu miconazol); *P. ovale* este agentul patogen al matretei.

Pneumocystis carinii este agentul cauzal al pneumoniei, la pacientii imunocompromisi. Incadrarea sa taxonomica si ciclul de viata sunt controversate. Analiza secventei moleculelor de ARNr 16S (publicata inca din 1988) au indicat faptul ca acest agent infectios este asemanator microfungilor, mai exact drojdiei *Saccharomyces cerevisiae*. Analiza ulterioara a moleculelor de ADN mitocondrial si a diferitelor enzime sprijina ideea ca acest microorganism apartine fungilor. Totusi, din punct de vedere medical, este considerat inça protozoar. Faptul ca nu creste pe medii speciale pentru fungi si nu este sensibil la antibiotice antifungice, a intârziat acceptarea clasificarii sale in regnul fungilor.

Se transmite prin inhalare si determina infectii pulmonare, fara a invada tesutul pulmonar. Nu se transmite de la persoana la persoana. Prezenta chistilor in alveolele pulmonare induce un raspuns inflamator care determina acumularea unui exudat care blocheaza oxigenarea sângelui. Infectia se produce când mecanismele de aparare ale gazdei, de exemplu când numarul de limfocite Th, sunt reduse. Aceasta explica numarul mare de cazuri de pneumonie cu *P. carinii* la pacientii cu SIDA sau la copiii prematuri sau debili. *P. carinii* are o larga distributie in natura ; astfel, este prezent la animale (cai, oi, rozatoare), ca si la 70% dintre oameni, la care infectii le sunt asimptomatice (purtatori). Simptome: febra, tuse, dispnee, tahipnee. Infectiile netratate au o

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

mortalitate de 100 %. In cazul celor tratate, supravietuirea este de 50 % la primul episod. In stadiile terminale ale bolii SIDA se produc si infectii extrapulmonare (ficat, splina, ganglioni limfatici, maduva osoasa).

B. Caractere generale si diagnosticul de laborator al infectiilor determinate de microfungi filamentosi (mucegaiuri)

Microfungii filamentosi sunt microorganisme eucariote a caror forma de existenta vegetativa este reprezentata de un miceliu, format din filamente numite hife, care pot fi speptate, sau neseptate, caracter care diferentiaza fungii superiori, de cei inferiori. Au o existenta saprotrofa, dar se comporta si ca microorganisme conditionat-patogene, determinând in general boli secundare (micoze) la indivizi debilitati de boli primare severe cum ar fi TBC-ul, diabetul, leucemiile. Sporii sunt alergeni pentru om.

Cls. *Phycomycetes.* *Mucor sp. si Rhizopus nigricans* produc micoze pulmonare si complicatii de tipul localizarilor secundare, cerebrale si sinusale. Aceste infectii se caracterizeaza prin urmatoarele simptome: dispnee, febra, dureri toracice, anorexie, ulceratii bucale sau ale limbii, limfadenopatie, hepatosplenomegalie. Bolnavul expectoreaza o sputa mucoida in care se pot observa mulaje bronsice de culoare neagra.

Diagnosticul de laborator. Prin examenul direct al sputei este dificil de evidentiat ciuperca. Un diagnostic cert se bazeaza pe insamântarea produsului patologic pe medii speciale pentru microfungi (evitând contaminarea cu spori din aer), urmata de incubare (la 37 °C, cu exceptia speciei *R. nigricans* care se incubeaza sub aceasta temperatura) timp de 4 – 5 zile si observarea coloniilor. Din coloniile izolate se fac preparate proaspete L/ l care se observa microscopic pentru evidentierea sporangioforilor (fig. 51). Se face un test de patogenitate, prin inocularea unei suspensii realizate dintr-o colonie izolata, la animale. Dupa 3 saptamâni se sacrifica si pot fi observate microabcese in rinichi, ficat, si ganglioni limfatici, iar in lichidele extracelulare pot fi evidentiate la microscop filamente miceliene. Este important diagnosticul diferential fata de TBC (cu care poate coexista), aspergiloza pulmonara, pneumonii, abcese, tumori benigne sau maligne si alte afectiuni pulmonare.

Se trateaza cu amfotericina B (tratamente de lunga durata 4 – 8 saptamâni), timp in care se recomanda intreruperea tratamentului cu corticosteroizi, care favorizeaza generalizarea, se trateaza boala primara (TBC, diabet) si se sustine rezistenta generala a organismului (alimentatie, vitamine, odihna). In mucormicozele bine localizate se fac interventii chirurgicale, sub protectie de antibiotice.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

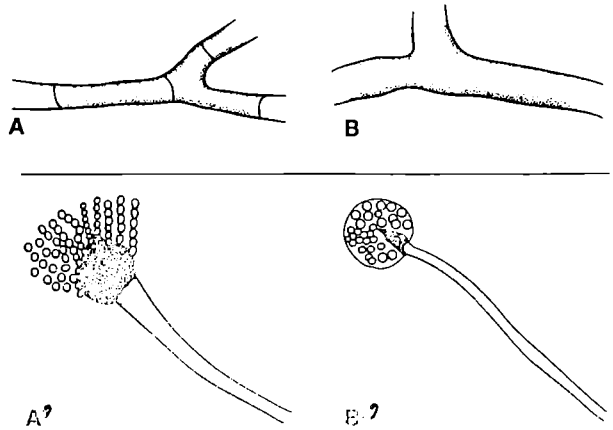


Fig. 51, A si B. Hife de *Aspergillus sp.* si *Mucor sp.* in tesuturi. A. *Aspergillus sp.* prezinta hife septate, cu ramificatii in forma literei V; B. *Mucor sp.* prezinta hife neseptate, ramificate in unghi drept. A' si B'. *Aspergillus sp.* si *Mucor sp.* in cultura. A'. Conidiofor de *Aspergillus sp.*, in forma de perie, cu spori exogeni, in siruri radiare; B'. Sporangiofor de *Mucor sp.*, cu spori endogeni formati intr-un sporangiu.

Cls. *Ascomycetes.* In aceasta clasa este inclus grupul *fungilor dermatofiti*, numiti astfel deoarece determina infectii ale pielii denumite generic dermatomicoze sau dermatofitii. Acesti microfungi au afinitate pentru tesutul cornos si pot determina liza acestuia, fiind deci *keratofile* si *keratolitice*. In tesutul cornos, la nivelul pielii acoperite cu par sau glabre (mai ales la pliuri), sunt prezente hife si artrospori.

Infectiile pot fi superficiale, cu frecventa cea mai mare, subcutanate si infectii dobândite pe cale respiratorie, dar cu manifestari cutanate. Speciile de fungi dermatofiti cele mai frecvent izolate in clinica apartin genurilor: *Epidermophyton, Trichophyton, Microsporum.* Dermatofitii sunt diseminati in natura prin artrospori,. Dupa sursa primara de infectie, care poate fi reprezentata de animale, om, sol, *speciile dermatofite* sunt denumite *zoofile, antropofile* si *geofile*. In zonele temperate, *Trichophyton verrucosum* (gazda primara - bovine) si *Microsporum canis* (gazda primara – câini, pisici) sunt cei mai comuni agenti fungici zoofili ai infectiilor umane. Specia geofila *Microsporum gypseum* este un agent patogen neobisnuit al infectiilor umane, dar este prezent la indivizii expusi, gradinari si agricultori. Dermatofitii antropofili sunt agentii cauzali cei mai comuni ai infectiilor cutanate.

Speciile dermatofite difera prin distributia geografica si prin predilectia pentru anumite situsuri din organism. Dermatofitii sunt keratinofile si invadeaza structurile keratinizate ale corpului: pielea, parul si unghiile. Infectiile se produc ca urmare a contactului cu artosporii sau

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

cu hifele cu perete celular mai subtire, care se formeaza in gazde (prin germinarea sporilor) si care sunt prezente in scuame si par, in care pot supravietui timp de luni de zile. Termenul latinesc *tinea* , care inseamna molie sau vierme, este folosit pentru infectiile dermatofile, deoarece initial acestea erau considerate a fi determinate de un parazit asemanator unui vierme. "Tinea capitis" afecteaza parul si pielea capului, "tinea corporis " afecteaza corpul, iar "tinea pedis" afecteaza picioarele. Leziunea tipica pentru infectiile dermatofile este o leziune circulara, cu margini ridicate. Principalul simptom este gratajul (scarpinatul), in diferite grade. Pielea este adesea uscata si uneori crapata (mai ales cea interdigitala); infectiile parului pot determina pierderea lui. Intensitatea inflamatiei asociate variaza dupa specie, fiind de obicei mai mare in cazul speciilor zoofile, compatativ cu cele antropofile.

Dermatofitiile sunt boili contagioase prin contact direct, care se diferentiaza in functie de localizare in :

1) dermatofitii ale pielii acoperite cu par: microsporii, trichofitii, favus, kerion;
2) dermatofitii ale pielii glabre: herpes circinat, sycosis;
3) dermatofitii ale pielii pliate: piciorul atletului, eczema marginala de Hebra;
4) dermatofitii ale fanerelor: onixis, perionixis.

1) Microsporiile determina zone de alopecie (de pierdere a parului) rotunde, mari si rare.

Trichofitiile determina aparitia de zone de alopecie, neregulate, mici si numeroase.

Favus – elementul caracteristic este godeul favic localizat la baza firului de par, care lasa cicatrici permanente.

Kerion – inflamatia puternica este urmata de caderea brusca si masiva a parului.

2) Sycosis – este echivalentul kerionului, pe pielea glabra.

Herpesul circinat se caracterizeaza prin aparitia de papule eritemo-scuamoase, care cresc in cercuri concentrice, la marginea carora se observa vezicule.

3) Piciorul atletului se poate prezenta sub doua forme: a) o forma acuta, manifestata prin vezicule mici pruriginoase, pe pielea plantei si in zona interdigitala; b) o forma cronica, manifestata prin uscarea tegumentelor si aparitia de fisuri interdigitale si plantare insotite de prurit si miros dezagreabil.

Eczema marginala de Hebra determina placarde eritemo-scuamoase in zona inghinala.

4) Onixis si **perionixis** sunt infectii localizate la baza si in jurul unghiilor. Leziunile caracteristice determina decolorarea bazei unghiei si caderea consecutiva a acesteia.

Speiile de dermatofiti difera si prin capacitatea lor de a declansa un raspuns imun: anumite specii (*Trichophyton rubrum*) determina infectii cronice sau recaderi, in timp ce alte

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

specii induc o rezistenta pe termen lung la reinfectie. La anumiti bolnavi, antigenele fungice circulante determina o reactie de hipersensibilitate a pielii (eritem sau vezicule). Când pielea devine crapata si degradata ca rezultat al infectiei, devine sensibila la suprainfectie, mai ales cu bacterii Gram negative. Foarte rar, fungii dermatfiti invadeaza tesutul subcutanat pe calea vaselor limfatice si determina aparitia de granuloame si edeme. Diseminarile in ficat, creier, pot fi fatale.

Diagnosticul de laborator se bazeaza in mare masura pe cultivarea pe mediu Sabouraud a produsului patologic (scuame, tesut de inflamatie din leziuni). Majoritatea speciilor de *Microsporum* formeaza artrospori mici, in lanturi, pe suprafata firului de par (*endotothrix*), in timp ce speciile de *Trichophyton* apartin atât grupului *endothrix*, cât si grupului *ectothrix*, cu artrospori mari si raspânditi neuniform in interiorul firului de par. Confirmarea identificarii depinde de caracterele de colonie si microscopice ale fungilor cultivati pe mediu Sabouraud. Cresterea lor este relativ lenta (~ 2 saptamâni), metoda cultivarii fiind utila mai ales pentru determinarea sursei de infectie.

In infectiile dermatofite tratamentul este mai ales topic (local). Totusi, in infectiile parului si unghiilor sunt mai recomandate antifungicele orale (miconazol). Pentru infectiile unghiilor se recomanda griseofulvin pe cale bucala si aplicarea locala de agenti keratolitici (mixtura de acid salicilic si benzoic). Tratamentele sunt de lunga durata (infectii ale scalpului – 6 – 12 saptamâni, infectii ale unghiilor da la mâini – 6 luni si ale unghiilor de la picioare – 12 luni).

Aspergillus fumigatus, care este prezent pe frunze uscate, in praf, produce aspergiloze (aspergiloza traheobronsica si pulmonara, aspergilomul pulmonar, otomicoza aspergilara, endocardita aspergilara si septicemii). Simptomele acestor infectii sunt asemanatoare cu cele ale tuberculozei: tuse, expectoratie mucoida sau mucopurulenta, striatii sanguinolente, hemoptizie, febra, pierdere in greutate, oboseala, transpiratii nocturne, stare generala alterata. Formele traheobronsice se manifesta prin dureri presternale, febra mica, tuse cu expectoratie mucoida in care pot fi evidentiate elemente miceliene si spori. Formele bronhopulmonare se inregistreaza mai ales la barbati, adesea unilateral si debuteaza acut, prin febra mare, dispnee, tuse cu expectoratie mucopurulenta, hemoptizie (eliminare de sânge din tesutul pulmonar), stare generala alterata. Aceste infectii pot evolua spre diseminari pe cale hematogena si septicemie.

Aspergiloza bronhopulmonara alergica se manifesta prin simptome asemanatoare cu cele ale astmului bronhopulmonar si un titru mare de IgE cu specificitate fata de antigene ale genului *Aspergillus*. In expectoratia bolnavilor care are forma unor dopuri (mulaje bronsice) se evidentiaza hife. Astmul, cauzat de inhalarea de conidii, este prezent mai ales la persoane cu ocupatii predispozante (agricultura).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Diagnosticul de laborator. In probele bioptice se evidentiaza hife septate, ramificate care invadeaza tesuturile. In culturi pe mediu Sabouraud se observa la lupa binocular colonii cu lanturi radiare de conidii. Culturile sunt foart infectioase, astfel ca sunt necesare masuri de evitare a inhalarii sporilor. Evidentierea antigenului *galactomanan* in ser se face la pacienti cu aspergiloze invazive. Reactia de latex aglutinare (pe placa cu godeuri cu fond negru tip Pastorex).

Specia *Penicillium sp.* are conidiofori in forma de « pensula » (fig. 52) si este raspunzatoare, de penicilioze viscerale, mai ales pulmonare cu manifestari similare aspergilozelor.

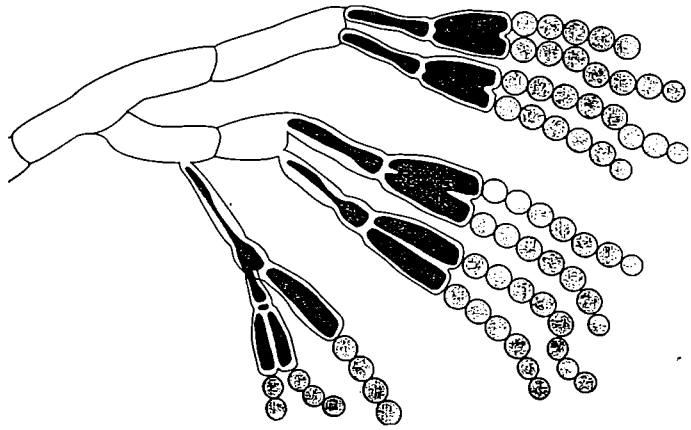


Fig. 52. Conidiofor de *Penicillium sp.* (schema).

Micotoxicoze

Unele specii de mucegaiuri produc *micotoxine* puternice, dintre care unele chiar cu proprietati cancerigene. Intre acestea se numara:

- *aflatoxinele*, produse de *Aspergillus flavus, Aspergillus paraziticus*, specii prezente pe semintele de porumb, alune, nuci, cafea (in general pe semintele de oleiaginoase), ca si in produsele lactate.

- *ochratoxina (A, B, C)* – produsa *de specii de Aspergillus* si *Penicillim,* in zonele cu climat rece (Europa de Nord si Canada), iar de specia *Aspergillus ochraceus* , numai in zonele tropicale si subtropicale. Ochratoxina A este cea mai toxica si se gaseste in cereale mucegaite, fasole si arahide ;

- *patulina-* produsa de *Aspergillus clavatus, Penicillium patulum, Penicillium claviforme, P. expansum, P. verucosum* (pe mere, in cidru) ;

- *acidul penicilic*, produs de *Penicillium cyclopium* (pe porumb, fasole, orz).

Spre deosebire de exotoxinele bacteriene, cu foarte rare exceptii, micotoxinele nu pot fi inactivate prin caldura. Aflatoxinele se produc la 30°C - temperatura optima de dezvoltare a

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

mucegaiurilor. S-a dovedit experimental efectul cancerigen al aflatoxinelor produse de specia *A. flavus*. Este posibil sa aiba acelasi efect si la om. Se pare ca pe lânga efectul direct, aflatoxinele ar avea si un efec imunosupresor. Este dificil de afirmat ca o anumita forma de cancer se datoreaza exclusiv toxinelor fungice; efectul substantelor cancerigene insa, se insumeaza (teoria cauzalitatii multiple).

Desi mucegaiurile se dezvolta la suprafata produselor alimentare, micotoxinele difuzeaza in profunzimea acestora, astfel indepartarea stratului superficial care contine miceliul, nu inlatura riscul ingerarii de micotoxine. Majoritatea micotoxinelor nu determina imbolnaviri acute, dar prin ingerare repetata produc intoxicatii, numite micotoxicoze. Acestea se pot manifesta si ca hepatite toxice, sau evolueaza spre cancere de ficat. IARC a stabilit ca printre cancerigenii cu risc sigur la om se afla si aflatoxinele. Zonele geografice unde hrana este puternic contaminata cu cu aflatoxine (zone calde si umede), corespund cu zonele in care incidenta cancerului hepatic este crescuta.

Aflatoxinele sunt un grup de substante inrudite cu difurocumarinele, izolate pentru prima data din celulele speciei Aspergillus flavus. Ulterior s-a demonstrat ca si alte specii de mucegai produc aflatoxine; distributia lor in natura este ubicvitara, exceptie facândexceptie zonele cu clima mai rece, cum ar fi nordul Europei si Canada. Cele mai multe lucrari privind contaminarea cu aflatoxine se refera la arahide, faina de arahide, dar s-au pus in evidenta si in cereale- grâu, ovaz, porumb, seminte oleaginoase (soia), ca si in brânzeturile fermentate care nu sunt pastrate in conditii de temperatura si umiditate corespunzatoare.

Aflatoxinele sunt cancerigene la soarece, sobolan, peste, rata si maimuta, administrate pe mai multe cai, inclusiv calea orala si induc in special cancer hepatic, de colon si rinichi. La om exista o corelatie pozitiva intre media concentratiei aflatoxinelor din alimentatia populatiei si incidenta cancerului hepatic primar. Nu exista insa date prin studii de caz (individuael), privind valoarea ingerarii cronice de aflatoxine si efectul cancerigen la om. Totrusi, tinând cont de efectul cancerigen puternic asupra multor specii de animale, precum si de distributia geografica a cancerului primar hematic, care se coreleaza cu expunerea populatiei la aceste micotoxine, se poate afirma ca si omul este sensibil la efectul cancerigen al aflatoxinelor, care se situeaza cu o probabilitate mare printre factorii de risc in procesul de carcinogeneza, in monografia (in 20 de volume - 1979) elaborata de Agentia Internationala de Cercetare a Cancerului (International Agency for Research on Cancer - IARC).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

PRINCIPII DE DIAGNOSTIC MICROBIOLOGIC

- consideratii generale

O preocupare importanta a microbiologilor este stabilirea unui diagnostic microbiologic corect, imaginarea unor teste de laborator necesare acestuia si monitorizarii incidentei bolilor infectioase, ca si a unor masuri necesare prevenirii acestor boli. Pe de alta parte, clinicienii asteapta de la microbiologi identificarea agentilor patogeni, testarea sensibilitatii tulpinilor microbiene la antibiotice si o raportare rapida a rezultatelor care sa furnizeze informatii relevante necesare deciziilor medicale.

In general, este importanta semnalarea prezentei unei infectii, determinarea naturii sale specifice si furnizarea de date care sa permita instituirea unui tratament timpuriu. Pentru stabilirea tratamentului, diagnosticul microbiologic timpuriu este mai urgent in bolile infectioase, decât in orice alt tip de proces patologic. In multe infectii, morbiditatea si mortalitatea pot fi reduse semnificativ daca se instituie in timpul cel mai scurt un tratament corect; in alte infectii, spitalizarea poate fi evitata sau scurtata si interventiile chirurgicale specifice pot fi evitate, daca un tratament antimicrobian este administrat rapid.

Cuantificarea rezultatelor. Acest concept nu a fost cu adevarat evaluat in microbiologie, decât in cazul uroculturilor, desi poate fi folosit si in alte situatii. De exemplu, poate ajuta la: 1) diferentierea unui microorganism prezent ca un "contaminant", de unul implicat activ in infectie; 2) determinarea importantei relative a diferitelor microorganisme in infectiile mixte. In mod obisnuit, cuantificarea uzuala prin metoda dilutiilor sau prin metoda ansei calibrate nu este necesara. Numarul microorganismelor prezente poate fi apreciat cu "crestere abundenta", "crestere moderata" sau "crestere saraca", pe baza coloratiei Gram si a cresterii constatate pe o placa cu mediu de izolare (de ex., colonii extinse pe grupul 2 de striuri, pe grupul 3 etc.). Coloratia Gram este importanta datorita diferentelor in biologia, sensibilitatea fata de agenti antimicrobieni, rata de crestere a bacteriilor Gram pozitive si Gram negative, care pot fi corelate cu exigentele lor nutritive sporite (in cazul germenilor pretentiosi),.

Diferitele metode de diagnostic (clasice si moderne), de detectare si ulterior de identificare a agentilor infectiosi, au grade de sensibilitate diferite, cu praguri diferite in ceea ce priveste densitatea numerica initiala a bacteriilor in proba patologica, dupa cum reiese din tabelul nr. 12.

Printre disciplinele biologice care au realizat in ultimii ani progrese considerabile in materie de automatizare, bacteriologia medicala se numara printre cele care au asteptat cel mai mult progresul tehnic.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabel nr. 12. Principalele tipuri de metode de detectare a bacteriilor in probele patologice, in functie de densitatea numerica a bacteriilor, care ilustreaza si gradul de sensibilitate a metodelor.

Bacterii - Densitate numerica/ greutate	Metoda	Pragul de detectare
10^6 - 1 ng		
10^5 - 0,1 ng	Microscopie	$> 10^5 - 10^6$ bacterii
	Serologie	$>10^5$ bacterii – 0,1ng
10^4 – 0,01 ng		
10^3 – 1pg	Sonde	$> 10^3 - 10^5$
10^2 – 0,1 pg		
10 - 0, 01 pg	Sonde ramificate	$> 10^1 - 10^3$
1 - 1 fg	PCR / Cultura	$> 1 - 10^2$ bacterii

Prima etapa in evolutia tehnologica a bacteriologiei medicale a constat in disponibilitatea galeriilor miniaturizate, gata de a fi utilizate, cu caractere de identificare bine ordonate si usor de folosit, care au permis caracterizarea genurilor si speciilor si identificarea precisa si rapida a acestora. Desi metodele clasice ramân utile intr-un numar mare de cazuri, pentru bacteriile greu cultivabile, metodele moleculare cum ar fi amplificarea genica *in vitro* (prin tehnica *PCR*) si secventierea moleculelor de ARN 16 S, au permis progrese spectaculoase atât in cercetare, cât si in diagnosticul bacteriologic. De exemplu, in ultimul deceniu, prin astfel de metode au fost detectate si identificate bacterii patogene, anterior necunoscute : *Bartonella henselae, Tropheryma whippelii.* Automatizarea mai accentuata a tehnicilor moleculare este o necesitate care ar face aceasta tehnologie accesibila unui numar mai mare de laboratoare.

A doua etapa in evolutia tehnologica a constat in automatizarea tehnicilor de studiu a sensibilitatii la agenti antimicrobieni prin microdilutie in mediu lichid, ceea ce a permis sa se acceada la o simplificare metodologica si o exprimare parametrica a rezultatelor. Cuplarea tehnicilor de identificare, cu aceste sisteme de citire interpretativa a antibiogramelor usureaza munca si interpretarea rezultatelor de catre microbiologi. Totusi antibiograma realizata prin metoda difuzimetrica ramâne foarte utila pentru anumite genuri si specii bacteriene.

A treia etapa in evolutia tehnologica a constat in automatizarea unui examen, considerat pe drept cuvânt, ca cel mai important in domeniul bacteriologiei clinice: *hemocultura*, un

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

examen fundamental pentru diagnosticul bacteriemiei si septicemiei. Infectiile grave, generalizate necesita un diagnostic rapid, pentru a institui rapid antibioterapie tintita si eficienta.

Metode de diagnostic :

I. **Diagnosticul microbiologic (direct)**

II. **Diagnostic imunologic (indirect)**

III. **Diagnosticul infectiilor si identificarea agentilor patogeni cu ajutorul tehnicilor moleculare.**

I . Diagnosticul microbiologic (direct) necesita parcurgerea urmatoarelor etape (vezi Anexa I):

1. **Prelevarea si transportul produselor patologice;**
2. **Examenul direct al produselor** : macroscopic si microscopic (preparat L/l);
3. **Izolarea in cultura pura** a agentului patogen incriminat in etiologia unei infectii (prin insamântare pe un mediu de cultura adecvat - medii de cultura uzuale, selective sau de imbogatire);
4. **Identificarea agentului patogen** se face in mai multe etape (vezi Anexa I), dupa insamântarea pe medii de cultura speciale si examinarea urmatoarelor proprietati:
   - **Caractere de cultura si de colonie** (dupa insamântarea pe diferite medii lichide si solide);
   - Examenul microscopic permite determinarea **tipului morfologic** (fig. 53) si a **afinitatilor tinctoriale** (dupa efectuarea de frotiuri colorate prin metoda Gram (fig. 54) si prin metode selective (pentru evidentierea sporilor, capsulei, incluziilor);
   - **Caractere biochimice (metabolice)**; studiul acestor caractere permite determinarea biotipului si o identificare destul de precisa, deoarece proprietatile biochimice sunt expresia unor determinanti genetici cromozomali stabili;
   - **Caractere de patogenitate si virulenta**: studiul capacitatii de a initia o infectie la animale sensibile de laborator; evidentierea proprietatilor hemolitice, citolitice;
   - **Sensibilitatea/rezistenta** la anumite substante antibiotice si chemoterapeutice (proprietati determinate de determinanti genetici cromozomali stabili, utile identificarii anumitor specii);
   - **Interpretarea rezultatelor si identificarea agentului infectios.**

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

5.Determinarea spectrului de sensibilitate la antibiotice (a antibiotipului) tulpinii bacteriene izolate, prin metoda antibiogramei.

6. Serotipizarea agentului patogen prin reactii serologice, permite caracterizarea din punct de vedere antigenic a tulpinii microbiene izolate;

7. Tipizarea cu ajutorul fagilor (lizotipie), metoda aplicata mai ales in studiile epidemiologice.

1. Prelevarea si transportul produselor patologice

Recomandari generale

- Recoltarea de probe corespunzatoare (de ex. sânge si lichid cefalorahidian in cazul unei suspiciuni de meningita);
- Recoltarea probei trebuie sa se faca la momentul potrivit, in timpul fazei acute a bolii;
- Daca este posibil, proba trebuie recoltata inainte de inceperea tratamentului cu substante antimicrobiene;
- Colectarea unei cantitati suficiente de produs biologic si un numar adecvat de probe (de ex. o cantitate suficienta de sânge/ser pentru mai mult de un set de determinari);
- Evitarea contaminarii produsului prin:
    - microbiota normala (de ex. urina se recolteaza din jetul mijlociu);
    - echipament nesteril;
- Utilizarea unor containere potrivite si medii de transport corespunzatoare;
- Etichetarea corecta a probelor;
- Completarea formularului de ancheta cu informatii clinice si o posibila etiologie;
- Stabilirea legaturii cu laboratorul si informarea acestuia de eventuale teste necesare;
- Transportul probelor biologice la laborator in timpul cel mai scurt, perioada in care trebuie mentinute conditiile necesare mentinerii viabilitatii agentilor patogeni eventual prezenti in probe; aceste conditii se refera la:

- Temperatura – care trebuie sa fie optima pentru supravietuirea tipului de germeni banuiti; de ex. speciile de *Neisseria* sunt sensibile la temperaturi scazute, temperatura optima de transport a probelor suspecte fiind de 37°C, in timp ce pentru produsele polimicrobiene, temperatura optima de transport este de 4°C, evitându-se multiplicarea germenilor asociati, prezenti in mod normal in produsul biologic respectiv;
- Timpul de supravietuire al agentilor patogeni in probe, pâna la prelucrarea acestora in laborator; timpul maxim este in medie de 6 ore, dar poate fi prelungit prin utilizarea mediilor

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

de transport sau de conservare, care contin in acelasi timp si factori inhibitori ai multiplicarii microorganismelor asociate (ex. mediu Stuart);

- Potentialul redox al mediului si conditia de anaerobioza, necesara transportului bacteriilor anaerobe, asigurata in recipiente cu azot sau dioxid de carbon sau cu un agent reducator; seringa de recoltare a probelor (sânge sau lichid de inflamatie a tesuturilor afectate) nu trebuie sa contina aer, iar acul trebuie sa fie infipt intr-un dop de cauciuc inainte de recoltare;

Conditii particulare de recoltare si transport ale principalelor produse biologice recoltate in cazul bolilor infectioase

- **Exudatul nasofaringian** – se recolteaza in infectii ale cailor respiratorii; recoltarea se face cu tampon de vata steril, dimineata, pe nemâncate, inaintea de periajul dintilor recoltarea se face prin miscari circulare pe suprafata amigdalelor si a peretelui posterior al faringelui. Se evita atingerea limbii. Perioada pâna la prelucrarea in laborator a probelor nu trebuie sa depaseasca 2h, când acestea sunt pastrate la temperatura camerei sau maximum 4 h la 4°C.
- **Sputa** – se recolteaza in infectii bronho-pulmonare; recoltarea se face in placi Petri sau recipiente cu gât larg sterile, din expectoratia consecutiva unui acces de tuse; se analizeaza portiunile mucoide, eventual sanguinolente.
- **Puroiul**, materialul vâscos care contine leucocite intregi sau degradate, celule ale tesutului afectat, fibrile de fibrina si corpi microbieni, se recolteaza cu ajutorul seringii din cavitati inchise si cu ansa, tampon sau pipete Pasteur din leziuni deschise. Perioada de transport a probelor nu trebuie sa depaseasca 2h la la temperatura camerei sau 4 h la 4°C.
- **Secretiile mucopurulente** de pe mucoase si tegumente se recolteaza cu tampoane, ace sau pipeta Pasteur sterile si se transporta rapid la laborator ;
- **Sângele** se recolteaza pentru examenul numit *hemocultura*, considerat cel mai important examen din bacteriologia clinica, deoarece este fundamental pentru stabilirea diagnosticului de bacteriemie si septicemie, forme grave ale bolilor infectioase care necesita un diagnostic rapid si instituirea tratamentului.
    - recoltarea se face, dupa aplicarea locala a unui antiseptic (tinctura de iod), din vena brahiala la adult si din vena jugulara la copil, direct in flacoanele cu mediu de cultura (unul pentru germeni aerobi si unul pentru anaerobi); se recomanda respectarea proportiei sânge /mediu de cultura (1 volum sânge/ 10 volume mediu).
- **Urina** - in mod normal este sterila, cu exceptia ultimei portiuni a uretrei;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- recoltarea se face, dupa o prealabila toaleta a zonei urinare (spalare cu apa si sapun), din jetul mijlociu de urina, pentru examenul numit *urocultura,* care poate fi calitativa si cantitativa (prin metoda clasica a dilutiilor sau cu teste rapide tip « Dip Streak »).

- **Secretia uretrala** se recolteaza cu ajutorul ansei sau cu tamponul steril si se transporta rapid la laborator (*Neisseria gonorrhoeae* = gonococul fiind sensibil sub 37°C).
- **Materiile fecale** eliminate spontan (in infectii digestive acute) sau dupa purgative saline, se recolteaza in coprorecoltoare cu mediu de transport si conservare a viabilitatii germenilor (Stuart sau Cary-Blair); se selecteaza pentru analiza bacteriologica a acestui produs numita *coprocultura*, portiunile care prezinta mucozitati, puroi, striuri sanguinolente si din mai multe zone.
- **Lichidul cefalorahidian, lichidul pleural** se recolteaza in meningite, afectiuni pleuro-pulmonare, prin punctie realizata de catre medicul specialist;
  - insamântarea se face la patul bolnavului sau produsele se transporta rapid la laborator (*Neisseria meningitidis* = meningococul nu supravietuieste sub 37°C mai mult de 30');
- **Alimentele** se analizeaza in cazul unei suspiciuni de toxiinfectie alimentara; inainte de insamântare, alimentele lichide se omogenizeaza, iar cele solide se maruntesc si se mojareaza in apa fiziologica sterila.
- **Vomismentele** se analizeaza in cazul unei suspiciuni de toxiinfectie alimentara.
  Resturile alimentare lichide se omogenizeaza, iar cele solide se maruntesc si se mojareaza in mod steril in apa fiziologica sterila; insamântarea se face la patul bolnavului sau produsul se transporta la laborator in maximum. 6 ore, la 4°C.
- **Produsele recoltate la necropsie** – se recomanda recoltarea lor in timpul cel mai scurt dupa deces si deschiderea doar in final a cavitatii abdominale, cu scopul evitarii contaminarii altor probe cu bacterii din microbiota intestinala; transportul se face la 4°C.

4. Identificarea agentului patogen

- se examineaza **caracterele de cultura si de colonie** (dupa insamântarea pe diferite medii lichide si solide);

- se examineaza microscopic proprietatile morfologice ale germenilor dezvoltati pe mediu lichid pe preparate proaspete L/l (pentru evidentierea mobilitatii, caracter util identificarii); din culturile dezvoltate pe mediu lichid/solid se fac preparate fixe – frotiuri, care se examineaza la microscopul optic cu obiectivul de imersie si se determina **tipului morfologic** (fig.53) si **afinitatile tinctoriale;** frotiurile se coloreaza prin metoda Gram (fig.54) si prin metode selective

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Fig. 53. Tipuri morfologice de baza la bacterii.

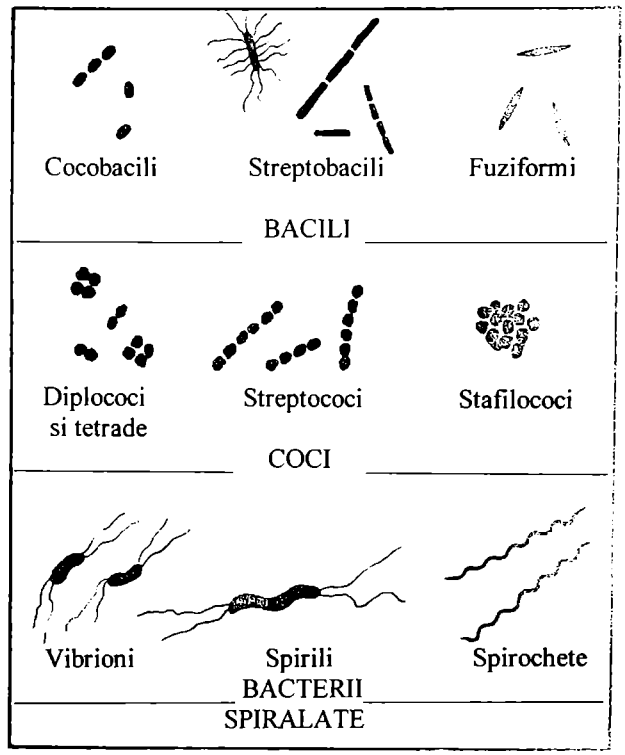


Fig. 54.Metoda coloratiei diferentiale Gram; reactivi si timpi de lucru. La microscop, acteriile Gram pozitive apar colorate in violet, iar cele Gram negative –decolorate de catre amestecul alcool-acetona si recolorate cu colorantul de contrast (fucsina sau safranina) – apar colorate in rosu.

REACTIVI	BACTERII GRAM-POZ.	BACTERII GRAM-NEG.
- (fixare la flacara)		
VIOLET DE GENTIANA Sol. hidroalcoolica fenicata 1% 1 – 2 min - spalare		
Solutie LUGOL 1: 2: 300 (I_2: KI : Apa dist.) 3 – 4 min		
Amestec ALCOOL-ACETONA (3: 1) 5 – 7 sec - spalare		
FUCSINA BAZICA Sol. hidroalcoolica fenicata 1% - dil 1/10 (sau SAFRANINA - spalare		

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

(pentru evidentierea sporilor, capsulei, incluziilor), caracterul Gram si prezenta diferitelor structuri intra- si extraparietale fiind utile identificarii;

- studiul proprietatilor biochimice ale microorganismelor=biotipizare; toate caracterele observate se noteaza si apoi se utilizeaza pentru identificarea taxonomica un anumit sistem (fig. 55).

-Interpretarea rezultatelor si identificarea agentului infectios -

- Sisteme de identificare a microorganismelor

Identificarea tulpinilor bacteriene se poate face cu ajutorul unor sisteme de identificare de tipul :

I. Chei dichotomice

II. Tabele de identificare (sisteme politetice) -

III. Programe de identificare asistata de calculator

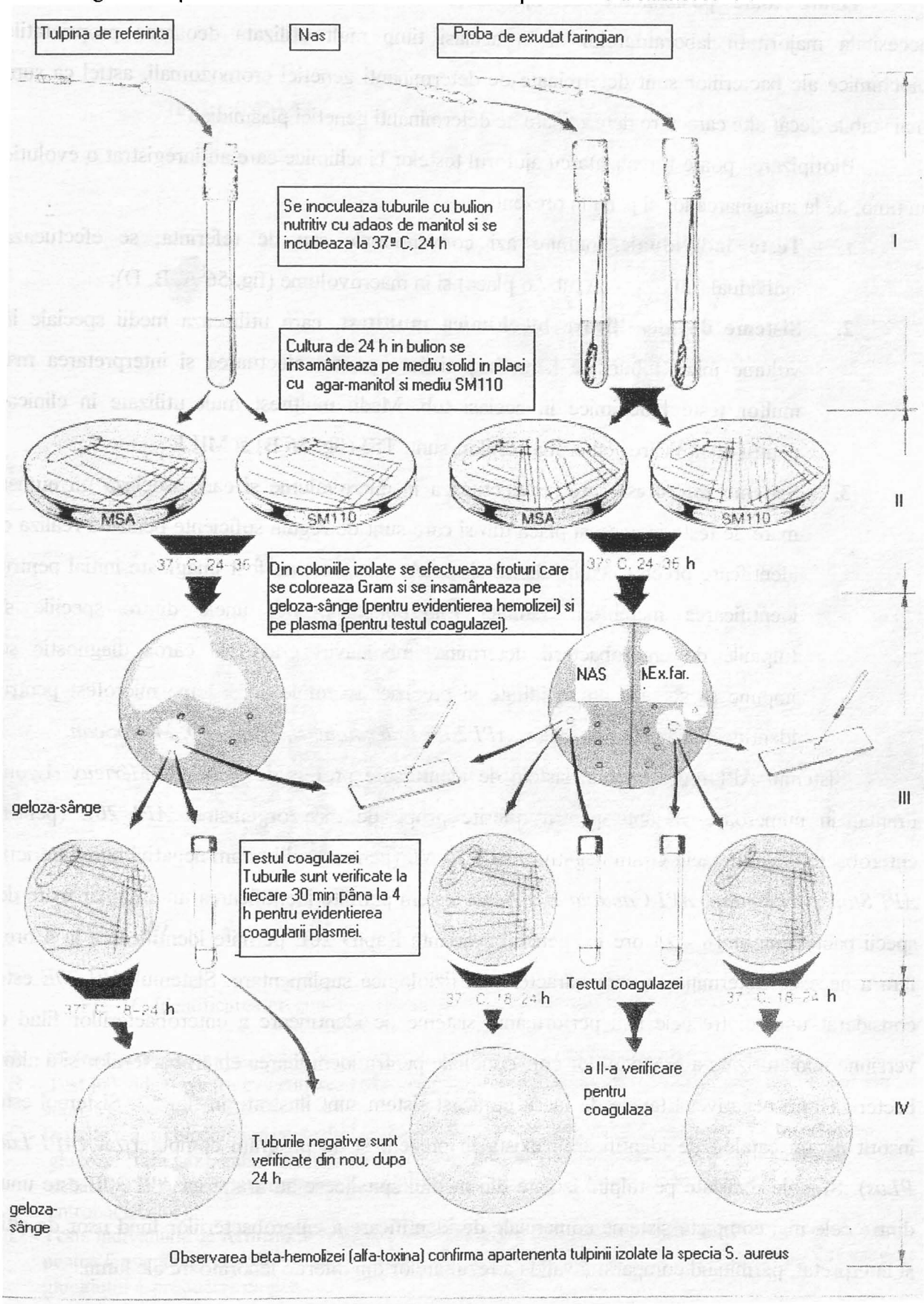
I. Cheile dichotomice pentru identificarea prezumtiva a microorganismelor sunt de acelasi tip cu cele utilizate pentru identificarea macroorganismelor, reprezentând sisteme secventiale in cadrul carora identificarea se face pas cu pas, inaintând progresiv de-a lungul a mai multor cai ramificate. Alegerea unei cai sau a alteia depinde de caracterele macroscopice sau microscopice observate sau rezultatele pozitive sau negative ale testelor biochimice efectuate. Prezinta dezavantajul ca, in cazul aprecierii incorecte a unui caracter, se porneste pe o cale gresita a cheii de identificare, care conduce la un diagnostic fals (vezi ANEXE II - VI).

II. Tabelele sau schemele de identificare politetice listeaza caractere importante pentru identificarea unui grup de bacterii si caracterele specifice speciilor de bacterii din grupul respectiv, frecvent izolate in clinica, de ex. stafilococi, enterobacterii. Prezinta avantajul ca fiecararui caracter i se acorda o valoare egala pentru identificare si, in acelasi timp, pentru fiecare specie este prezentat si procentul de tulpini pozitive pentru fiecare caracter semnificativ (vezi ANEXE VII - VIII).

III. Programele de identificare asistata de calculator au o baza de date mare, care permite identificarea corecta si calcularea gradului de asemanare a tulpinii de identificat cu tulpini de referinta ale aceleiasi specii bacteriene, semnalând si caracterele atipice ale tulpinii de identificat; calculeaza scorul de identificare si in cazul când acesta nu este maxim (99,9%), sugereaza teste suplimentare care ar putea imbunatati scorul si ar creste sansele de identificare finala; sugereaza si alti taxoni posibili. Exemple de programe de identificare: *P.I.B. (Probabilistic Identification of Bacteria), BACT.ID. (Bacterial identification), API Lab Plus.*

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Fig. 55. Etapele de lucru in izolarea si identificarea prezumtiva a stafilococilor.



https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Dintre toate posibilitatile de tipizare si identificare taxonomica, biotipizarea este accesibila majoritatii laboratoarelor si in acelasi timp mult utilizata deoarece proprietatile biochimice ale bacteriilor sunt determinate de determinanti genetici cromozomali, astfel ca sunt mai stabile decât alte caractere determinate de determinanti genetici plasmidiali.

Biotipizarea poate fi realizata cu ajutorul testelor biochimice care au inregistrat o evolutie in timp, de la imaginarea lor si pâna in prezent:

1. **Teste individuale**, numite azi conventionale sau de referinta; se efectueaza individual (un test – un tub / o placa) si in macrovolume (fig. 56 A, B, D);
2. **Sisteme de identificare biochimica multitest**, care utilizeaza medii speciale in volume mici (tuburi de hemoliza) si care permit efectuarea si interpretarea mai multor teste biochimice in acelasi tub. Medii multitest mult utilizate in clinica, pentru identificarea enterobacteriilor, sunt: TSI (fig. 56 B) si MILF .
3. **Sisteme microtest** care se efectueaza in microvolume si care asociaza un numar mare de teste in aceeasi placa/tub si care sunt de regula suficiente pentru a realiza o identifcare precisa. Multe dintre sistemele microtest au fost imaginate initial pentru identificarea membrilor familiei *Enterobacteriaceae*; unele dintre speciile si tulpinile de enterobacterii determina imbolnaviri grave, al caror diagnostic se impune sa se faca cu rapiditate si precizie. Exemple de sisteme microtest pentru identificarea enterobacteriilor: *API 20E, Enterotube II, Micro-ID, MicroScan.*

Sistemul API reprezinta un sistem de identificare produs de firma *BioMérieux* -Lyon, Franta, in numeroase variante pentru diferite grupe de microorganisme: *API 20E* (pentru enterobacterii si alti bacili Gram negativi), *API 20 NE* (pentru bacili Gram negativi non-enterici), *API Staph, API Strep, API Candida* etc. Acest sistem permite identificarea unui numar mare de specii bacteriene in 18 - 24 ore in general (varianta RapiD 20E permite identificarea in 4 ore) fara a necesita determinarea unor caracteristici fiziologice suplimentare. Sistemul *API 20E* este considerat unul dintre cele mai performante sisteme de identificare a enterobacteriilor fiind o versiune miniaturizata a procedurilor conventionale pentru identifcarea enterobacteriilor si a altor bacterii Gram negative. Etapele de lucru cu acest sistem sunt ilustrate in fig. 57. Sistemul este insotit de un catalog de identificare ; exista in prezent si un program computerizat (*API Lab PLus*). Studiile realizate pe tulpini izolate din mediul spitalicesc au aratat ca API 20E este unul dintre cele mai complete sisteme comerciale de identificare a enterobacteriilor fiind usor de citit si interpretat, permitând comparatia valida a rezultatelor din diferite laboratoare ale lumii.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

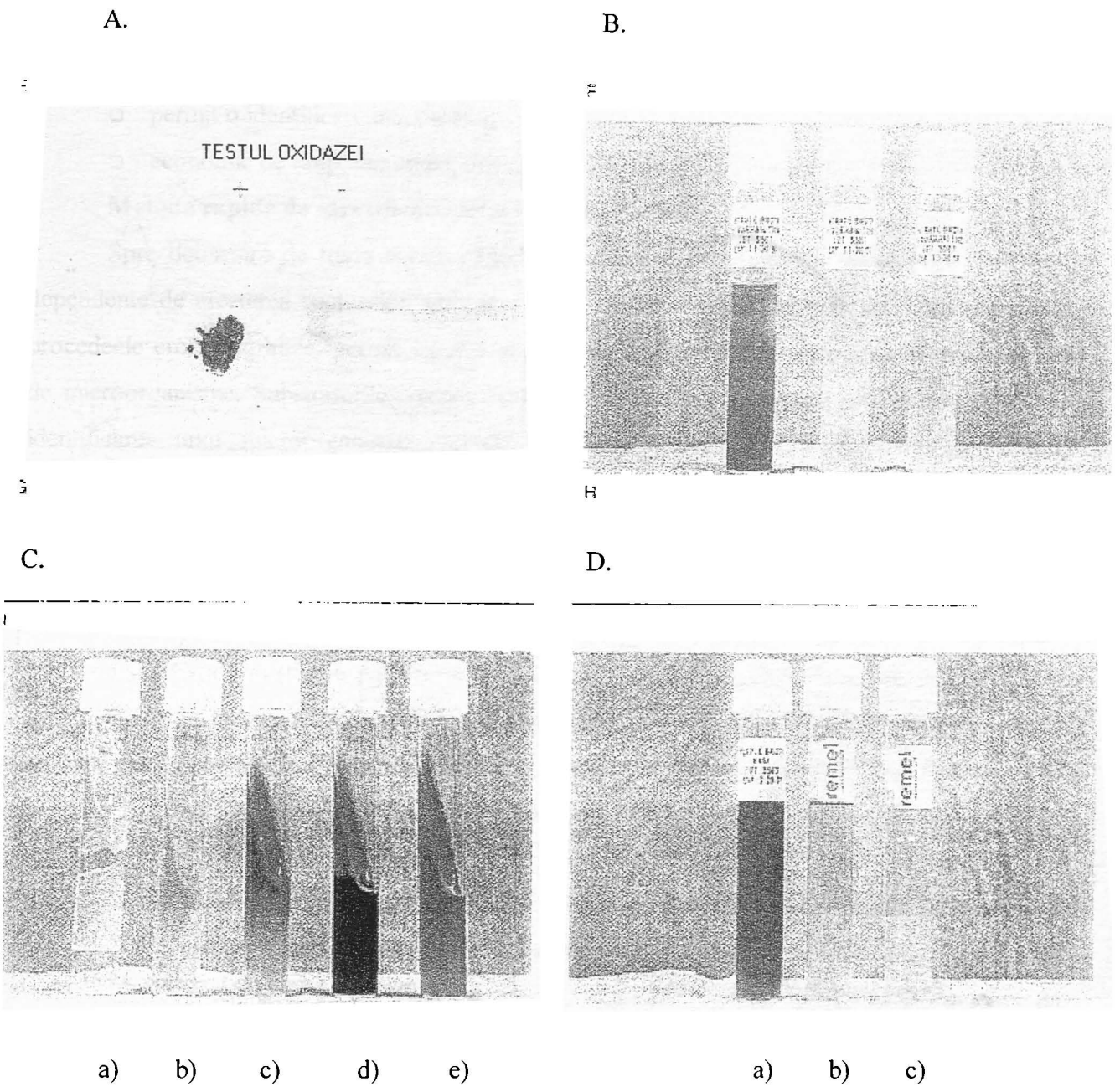
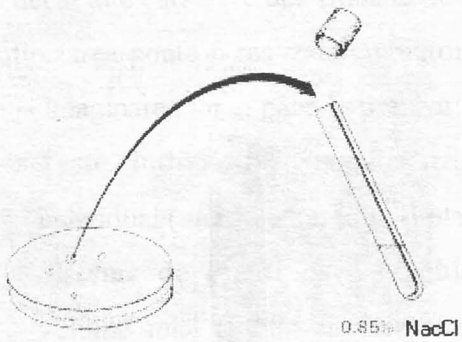


Fig. 56. Identificarea prezumtiva a Enterobacteriilor pe baza caracterelor biochimice.

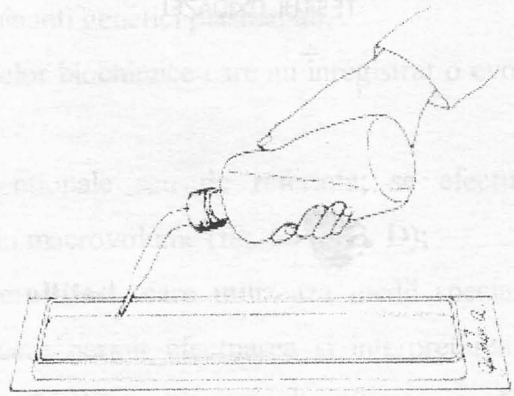
A – Metoda cromogena (test individual) pentru testul oxidazei (reactie pozitiva ⇒ stânga);
B - Test individual pentru evidentierea reducerii nitratilor la nitriti si N2 (reactie pozitiva ⇒ tubul din stâmga);
C - Diferite reactii biochimice pe mediul multitest TSI : a) fermetarea glucozei + gaz; b) fermentarea glucozei (fara gaz), zaharozei si lactozei; c) fermentarea glucozei (fara gaz), fara fermentarea zaharozei si lactozei; d) producere de H_2S; e) bacil Gram (-) nefermentativ (nu apartine entrobacteriilor);
D - Teste individuale de fermentatie + tuburi Durham (pentru colectarea gazului rezultat ; a) test pozitiv pentru fermentarea glucidului fara producere de gaz; b) test negativ; c) test pozitiv pentru fermentarea glucidului + producere de gaz.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

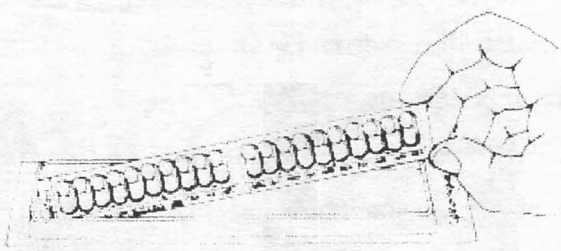
Fig. 57. Etapele de lucru ale identificarii biochimice a bacteriilor cu ajutorul galeriilor miniaturizate tip *API (BioMérieux)*.



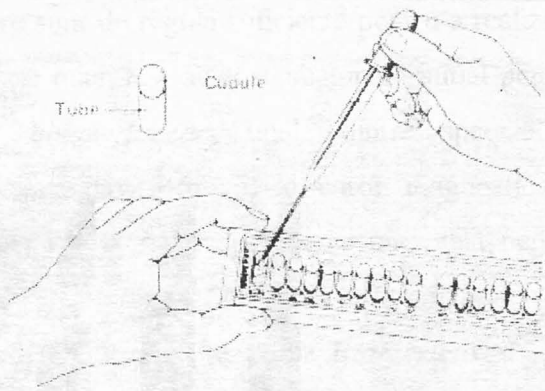
1 Se realizeaza o suspensie bacteriana in solutie salina fiziologica sterila, plecind de la o colonie de pe mediul pe care s-a facut izolarea in cultura pura a tulpinii de identificat



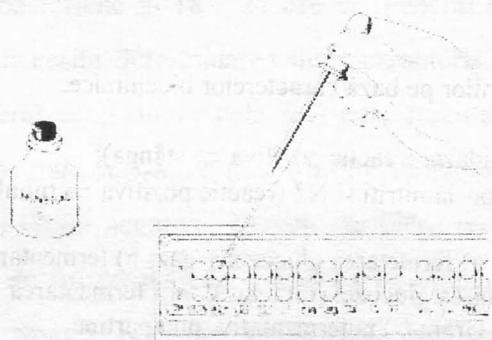
2 Se repartizeaza cca 5 ml de AD in camera de incubare pentru a realiza o atmosfera umeda.



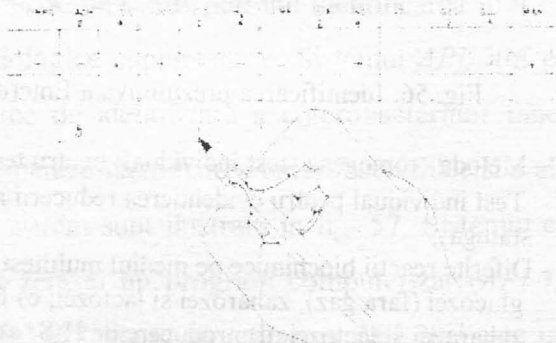
3 Se plaseaza galeria API in camera umeda.



4 Se repartizeaza suspensia bacteriana (inoculul) in toate cele 20 de compartimente.



5 Pentru realizarea conditiilor de anaerobioza in compartimentele destinate reactiilor ADH, LDC, ODC, H2S, URE, ser adauga ulei de parafina in portiunea deschisa (circulara) a acestora.



6 Dupa incubare si adaugarea reactivilor aditionali, se insumeaza cifrele corespunzatoare reactiilor pozitive, obtinindu-se un numar de cod cu 7 cifre, interpretarea facindu-se cu ajutorului catalogului API de identificare.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Atât sistemele multitest, cât si cele microtest, prezinta multiple avantaje:

- permit o identificare rapida comparativ cu testele conventionale;
- permit o identificare mai precisa;
- economie de timp, materiale, personal.

Metode rapide de identificare/detectare a bacteriilor

Spre deosebire de toate aceste metode de testare a proprietatilor biochimice care sunt dependente de cresterea bacteriilor, utilizarea unor teste cu substraturi enzimatice cromogene si procedeele cromatografice, permit laboratoarelor sa identifice precis si rapid numeroase specii de microorganisme. Substraturile cromogene detecteaza enzime preformate in bacterii si permit identificarea unor microorganisme specifice direct in produsele patologige, metoda nefiind dependenta de cresterea bacteriana. Rezultatele acestor teste rapide sunt considerate, in paralel cu cele traditionale, bazate pe cresterea pe medii selective, pe examinarea caracterelor de colonie si a celor morfologice observate pe frotiuri colorate Gram. Testele bazate pe utilizarea de substraturi cromogene, se utilizeaza in paralel si cu testele de tipul "spoturilor", cum ar fi testul catalazei si al oxidazei (fig.56 A), pentru o identificarea prezumtiva corecta a microorganismelor semnificative din punct de vedere clinic. Diferite variante ale acestor tehnici, ca si metoda gaz-cromatografiei pot fi folosite pentru detectarea produsilor bacterieni direct in probele clinice sau pentru a furniza informatii ajutatoare identificarii bacteriilor la nivel de gen si specie.

5. **Determinarea spectrului de sensibilitate (antibiotipului) tulpinii bacteriene izolate, prin metoda antibiogramei (Kirby - Bauer);** se determina spectrul de sensibilitate la un set de antibiotice, cunoscute ca fiind active pentru grupul de bacterii caruia îi apartine tulpina identificata, dar care sunt supuse fenomenului de dobândire a rezistentei, cu scopul alegerii celui mai potrivit pentru antibioterapie (fig. 59); determinarea concentratiei minime inhibitorii (C.M.I.) si minime bactericide (C.M.B.), utile determinarii proprietatilor farmacologice ale antibioticelor, ca si calcularii dozelor terapeutice sunt schematizate in fig. 58;
6. **Serotipizarea** permite caracterizarea din punct de vedere antigenic a tulpinii bacteriene izolate, prin evidentierea antigenelor bacteriene, cu seruri imune poli- si monospecifice, metoda aplicata mai ales in studiile epidemiologice; de ex. prin reactii de aglutinare bacteriana (directa) pe lama (fig. 60) si in tub; reactii de latex- aglutinare (aglutinare pasiva);

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

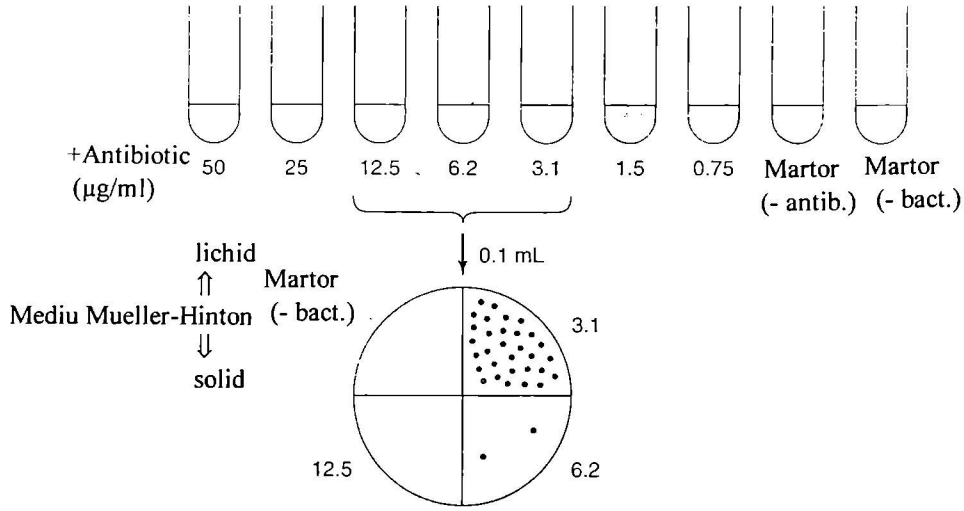


Fig..58. Determinarea concentratiei minime inhibitorii (C.M.I.) si a concentratiei minime bactericide (C.M.B.). Setul de tuburi care contin cantitati descrescatoare (dilutii binare) de substante antibiotice in mediu de cultura, se inoculeaza cu tulpina bacteriana de testat. Dupa incubare (la 37°C, 18 h), tuburile se examineaza macroscopic si se determina C.M.I., care este indicata de cea mai mica concentratie de antibiotic care inhiba cresterea bacteriana. (in acest exemplu 3,1 µg/ml). Pentru a evidentia si efectul bactericid C.M.B. (nu doar cel bacteriostatic, inhibitor al cresterii), se insamânteaza in placi cu mediu solid fara antibiotice, câte 0,1 ml din tuburile cu concentratii de antibiotic superioare C.M.I. Concentratia de antibiotic care inhiba aparitia de colonii in proportie de cel putin 99,9 % (in acest exemplu 6,2 µg/ml) indica C.M.B.

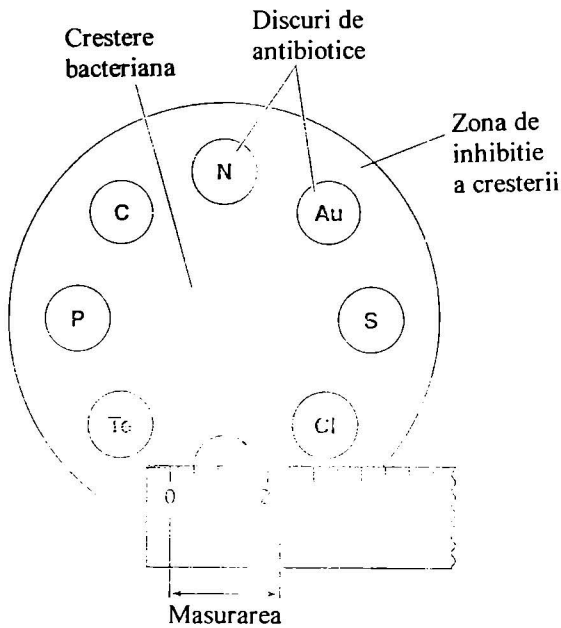


Fig. 59. Testarea sensibilitatii la antibiotice (antibiograma) prin metoda difuzimetrica Kirby- Bauer. Tulpina bacteriana testata (insamântata "in pânza" pe mediul solid Mueller-Hinton din placa, pe suprafata caruia s-au plasat discuri de antibiotice, dupa care placa a fost incubata la 37°C, 18 h) este sensibila la anumite antibiotice si rezistenta la altele (ex. N, T, Cl). Pentru ca tulpinile sa fie considerate sensibile, zonele de inhibitie a cresterii din jurul discurilor de antibiotice trebuie sa depaseasca anumite valoari-prag, valori care se gasesc in tabele speciale.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

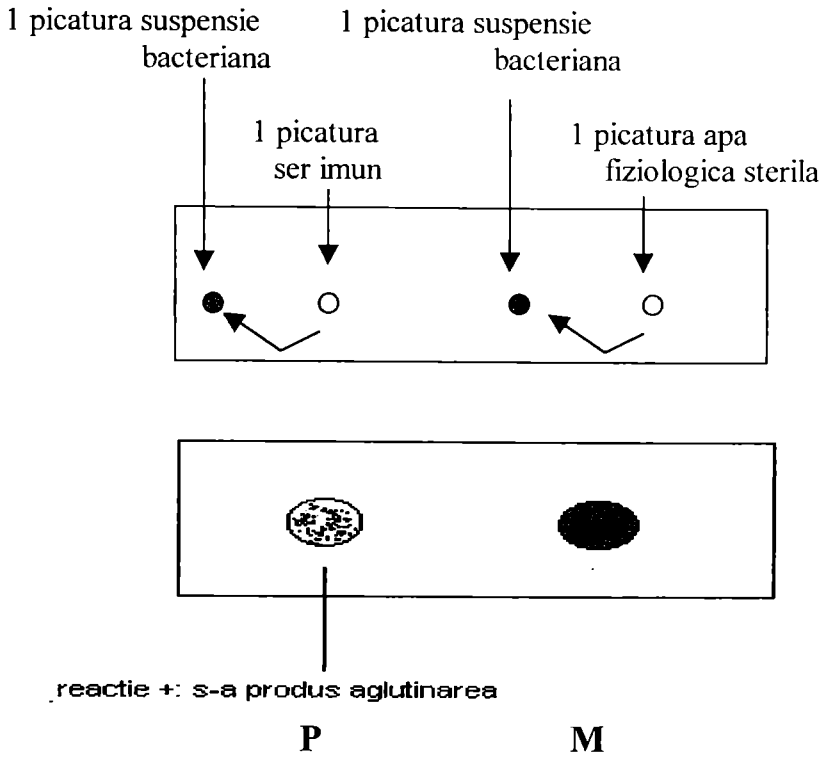


Fig. 60. Schema testului de aglutinare pe lama, realizat prin punerea in contact a unei suspensii bacteriene, realizata prin omogenizarea in apa fiziologica sterila a unei colonii bacteriene dintr-o cultura a tulpinii de serotipizat, cu seruri imune polispecifice si monospecifice, diluate corespunzator titrului reactiei pe lama, indicat de producator (P = proba, M = martor).

7. **Tipizarea cu ajutorul fagilor (lizotipie).** Metoda se bazeaza pe spectrul de gazda limitat al multor bacteriofagi, astfel ca unele linii fagice stabilesc relatii si un ciclu litic doar cu o anumita tulpina a unei specii bacteriene. Se utilizeaza seturi diferite de preparate fagice standardizate, destinate tipajului fagic al unor specii bacteriene, ale caror tulpini nu pot fi diferentiate prin metode biochimice sau serologice (de ex. pentru tipizarea unor specii ale genurilor *Staphylococcus, Corynebacterium, Salmonella*). Metoda este utila mai ales epidemiologiei, care studiaza distributia si circulatia tulpinilor bacteriene in populatie si se practica in Centrele Nationale de Referinta pentru bacteriile patogene respective ale Inst. Cantacuzino (etapele de lucru ale lizotipiei sunt schematizate in fig. 61).

II. Diagnostic imunologic (indirect)

- studiul raspunsului imun al organismului gazda, fata de agentul infectios nu este obligatoriu, pentru ca raspunsul imun fata de unii agenti infectiosi este tardiv, slab sau absent (de exemplu, in infectiile locale); se investigheaza:

- *Raspunsul imun mediat umoral* – metode de studiu:
  - *in vitro* – reactii serologice Ag-Ac, efectuate cu ser de pacient si antigene de diagnostic, efectuate cu scopul decelarii si titrarii anticorpilor specifici antigenelor utilizate;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- *in vivo* – intradermoreactii (I.D.R.) – cu antigene purificate, injectate intradermic, care permit demonstrarea faptului ca organismul respectiv este sensibilizat, are anticorpi fata de agentul patogen din care s-a extras antigenul inoculat.

- *Raspunsul imun mediat celular* – metode de studiu:
  - *in vitro* – testarea functiei leucocitelor PMNN, a macrofagelor (teste de migrare, de fagocitoza, histochimice), a limfocitelor T si B (testul transformarii limfoblastice);
  - *in vivo* – r.eactii de hipersensensibilitate intârziata mediata celular (48 ore).

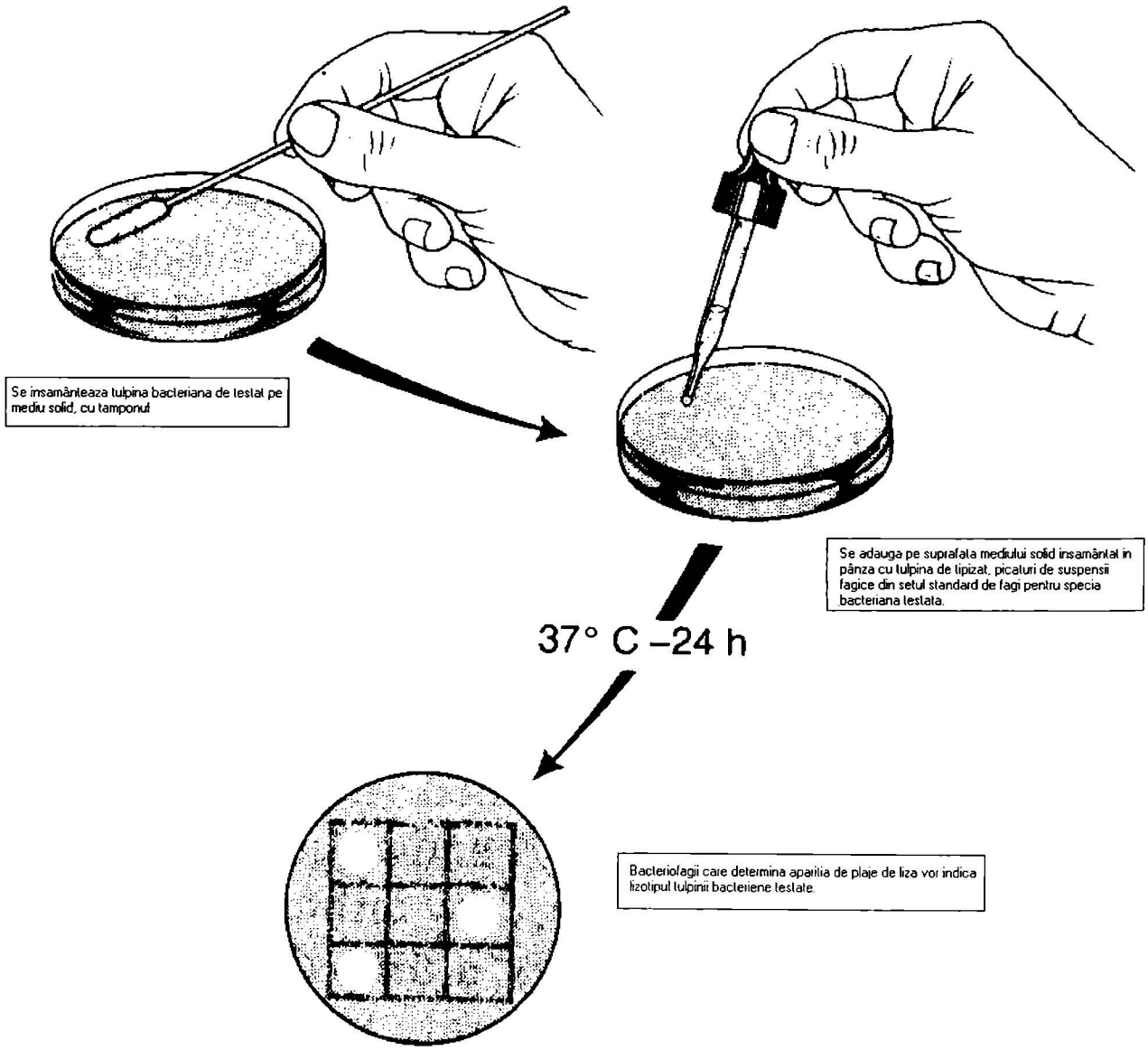


Fig. 61. Ilustrarea metodei lizotipiei (tipizarea tulpinilor bacteriene cu ajutorul fagilor litici), pe etape de lucru.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

III. Diagnosticul infectiilor si identificarea agentilor patogeni cu ajutorul tehnicilor moleculare.

Desi metodele clasice ramân utile intr-un numar mare de cazuri, pentru bacteriile greu cultivabile, metodele moleculare au permis progrese spectaculoase atât in cercetare, cât si in diagnosticul bacteriologic. Diagnosticul microbiologic bazat pe analize genetice prezinta numeroase avantaje:

1. Este foarte indicat in cazul microorganismelor cu crestere lenta sau care cresc slab sau nu cresc deloc pe medii de laborator, evitând incubarile prelungite si rezultatele fals negative.
2. Deoarece nu este necesara insamântarea probelor si cultivarea agentilor patogeni, probele patologice pot fi recoltate si pastrate prin inghetare perioade lungi de timp. Aceste probe sunt utile si pentru verificarea eficacitatii vaccinurilor.
3. Permit identificarea de noi specii prin compararea datelor obtinute prin metode moleculare, cu cele existente in bazele de date. De exemplu, in ultimul deceniu, prin astfel de metode au fost detectate si identificate bacterii patogene, anterior necunoscute : *Bartonella henselae, Tropheryma whippelii.*
4. Metodele moleculare pot fi utilizate in diagnosticul infectiilor cu bacterii parazite obligat intracelular (ex. *Rickettsia sp., Bartonella sp., Chlamydia sp.*) si virusuri care necesita pentru cultivare substraturi vii sau pentru care nu exista pâna in prezent metode de cultivare in conditii de laborator. Acesti agenti infectiosi pot fi identificati cu ajutorul unor *kit*-uri de diagnóstic molecular, standardizate si comercializate. Un exemplu in acest sens este bacteria *C. trachomatis* care poate fi evidentiata direct in probele patologice (secretie vaginala sau uretrala, urina) cu ajutorul unei variante a tehnicii PCR numita LCR (*Ligase Chain Reaction*) (vezi Cap. Bacterii parazite obligat intracelular - *Chlamydia sp.)*

Studiul markerilor genomici se realizeaza prin amplificarea unui fragment de ADN specific pentru o anumita unitate taxonomica microbiana (tehnica *PCR*), restrictie enzimatica pe genomul total sau pe un anumit fragment amplificat in prealabil, hibridizare cu sonde marcate.

Probe de acizi nucleici

Reprezinta o secventa de ADN care hibridizeaza specific cu o catena complementara. O proba poate fi construita pentru a detecta fie ADN, fie ARN. Probele pot fi mici (in lungime de aprox. 20 nucleotide) sau mari (câteva mii de nucleotide). Principiul de baza al tehnologiei

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

probelor de ADN este hibridizarea, care implica denaturarea moleculelor de ADN dublu catenare, in molecule monocatenare si detectarea acestora cu probe de ADN monocatenar marcate. Testul hibridizarii poate fi folosit pentru:

1) a demonstra inrudirea genetica (secvente omologe ale succesiunii de baze in ADN-ul diferitelor organisme, astfel ca au fost utilizate extensiv in construirea unor scheme taxonomice filogenetice, de obicei prin analiza secventelor de ARNr 16 S inalt conservate); de ex., pentru stabilirea taxonomiei bacteriilor apartinând genurilor *Campylobacter si Helicobacter*, s-au folosit tehnici moleculare: hibridizarea ADN –ARNr, analiza secventiala a moleculelor de ARNr 16S;

2) diagnosticul de laborator al unor boli infectioase. In acest caz, probele de ADN sunt utilizate pentru confirmarea unor rezultate obtinute prin metode conventionale sau ca o alternativa la aceste metode consumatoare de timp sau a unora foarte laborioase. Sunt de asemenea utilizate pentru detectarea directa in probele clinice a unor microorganisme patogene cu crestere lenta sau saraca, Aceasta **metoda directa** (fara procedura de amplificare a ADN) este mult mai putin sensibila, pentru ca numarul microorganismelor specifice prezente in proba, poate fi sub pragul de sensibilitate al testului. In absenta amplificarii inainte de testare, testele comerciale disponibile pot detecta cel putin 10^4 - 10^6 copii ale secventei specifice de ADN. **Prin amplificare, in varianta indirecta a tehnicii**, pot fi detectate 10 sau chiar mai putine copii initiale ale moleculelor specifice de ADN. Când probele sunt folosite pentru confirmarea identitatii unui microorganism cultivat, numarul copiilor -tinta depaseste cu mult pragul de sensibilitate al testului.

Studiul markerilor plasmidiali: stabilirea profilului plasmidial prin evidentierea la mai multe tulpini a prezentei aceleiasi plasmide (de **virulenta/ rezistenta la antibiotice**), constituind un prim indicator de similitudine;

- Extragerea plasmidelor, compararea greutatii moleculare prin electroforeza in gel de agaroza;
- Compararea profilurilor electroforetice ale plasmidelor dupa restrictie enzimatica;
- Se cerceteaza daca gena este prezenta pe acele plasmide, practicându-se hibridizarea dupa transferul ADN pe membrane de nylon (tehnica *Southern blott*).

De exemplu, existenta unor plasmide si determinanti genomici de rezistenta similari la tulpinile izolate din diverse medii poate demonstra transmiterea pe orizontala a determinantilor genetici de rezistenta ca efect al impactului ecologic al antibioticelor asupra bacteriilor.

Automatizarea mai accentuata a tehnicilor moleculare este o necesitate care ar face aceasta tehnologie accesibila unui numar mai mare de laboratoare.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

BIBLIOGRAFIE

1. ABBAS, A.K., LICHTMAN,A.H., POBER, J.S., 2000, *Cellular and Molecular Immunology.* Fourth Ed., W.B. Saunders Comp., Philadelphia.
2. ADELSMAN, MARGARET, SHIMIZU, YOJI, 1998, *Adhesion molecules.* In: "Encyclopedia of Immunology", P.J., Roitt, I.M., eds.), Sec. Ed., Academic Press Inc., San Diego California, p. 26 – 33.
3. ADU-BOBIE, JEANNETTE, FRANKEL, G., BAIN, C., GONCALVES, AZIZEDIDE G.,TRABULSI, L.R., DOUCE, G., KNUTTON, S., DOUGAN, G., 1998, *Detection of intimins α, β, γ and δ, four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens.* J. of Clinical Microbiol., **36 :** 662 – 668.
4. ALBERT, J.M., QADRI, F., HAQUE, A., BHUIYAN, N.A., 1993, *Bacterial clump formation at the surface of liquid culture as a rapid test for identification of enteroaggregative Escherichia coli..* Journal of Clinical Microbiol., **31:** 1397 – 1399.
5. ALCAMO, E., 1997, *Fundamentals of Microbiology.* Fifth Ed., Benjamin / Cummings Publ.Comp.
6. ALEXANDRU, D., 1996, *Biochimia si rolul fizio-patologic al moleculelor de adeziune celulara.* St. Cerc. Biochim., **39** (1-2)**:** 17 – 41.
7. ALLISON, A.C., EUGUI, ELSIE M., 1995, *Induction of cytokine formation by bacteria and their products.* In: "Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens. Cap. V. Strategies to overcome bacterial virulence mechanisms" (Roth, J.A., Bolin, Carole A., Brogden, Kim A., Minion, F.C., Wannemuehler, M.J. eds.). Sec. Ed., ASM Press, Washington, D.C., 303- 333.
8. AMANO, A., SHARMA, A., SOJAR, H.T., KURAMITSU, H.K., GENCO, R.J., 1994, *Effects of temperature stress on expression of fimbriae and superoxide dismutase by Porphyromonas gingivalis.* Inf. and Immun., **62:** 4682 – 4685.
9. ANDREMONT, A., RAIBAUD, P., TANCREDE, C., DUVAL-IFLAH, YVONNE, DUCLUZEAU, R., 1985, *The use of germe- free mice associated with human fecal flora as an animal model to study enteric bacterial interactions.* Bacterial Diarrheal Diseases, KTK Scient. Publish., Tokio, p. 219 - 227.
10. ANDREMONT, A., 1987, *Infections sur matériel d'infusion parentérale prolongée.* Médicine et maladies infectieuses, 323 - 325.
11. ANDREMONT, A., 1989, *Candida in the gactrointestinal tract: from colonization to disease.* In: "Opportunistic fungal infections*: Focus on fluconazole*" (Richardson, R.G., ed.). Royal Soc. of Medicine Services Internat. Congress and Symposium, Series No. 153.
12. ANDREMONT, A., 1990, *Ecosistème intestinal et antibiothérapie.* La Lettre de l'Infectiologue, Tome **V :** 100–103.
13. ANDREMONT, A., 1991, *Épidemiologie et diagnostic indirect des infections à levures en cancérologie.* J. Mycol. Med., 1, Suppl. **I:** 2 - 3.
14. ANDREMONT, A., 1992, *Effect of beta-lactam antimicrobial agents on the intestinal écosystem and its possible role in antibiotic-associated diarrhoea.* In: "Cefaclor: Into the next decade" (Cole, P., ed.). Royal Society of Medicine Services International Congress and Symposium Series No. 188, p. 61 – 65.
15. ANGHEL, I., COJOCARU, I., TOMA, N., COJOCARU, J., 1989, *Biologia si tehnologia levurilor.* vol. I, Edit. Tehnica, Bucuresti, p. 15-26.
16. ANGHEL, I., VASSU, T., SEGAL, B., BERZESCU, P., HERLEA, V., DAN, V., OANCEA, I., KATHREIN., I., 1991, *Biologia si tehnologia levurilor.* vol. II, Edit. Tehnica, Bucuresti, p. 360 - 363.
17. ANWAR, H., DASGUPTA, M.K., COSTERTON, W.J., 1990, *Testing the susceptibility of bacteria in biofilms to antibacterial agents.* Antimicrobial agents and chemotherapy, **34:** 2043 – 2046.
18. ANWAR, H., STRAP, J.L., COSTERTON, W.J., 1992, *Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy.* Antimicrobial agents and chemotherapy, **36:** 1347 – 1351.
19. BAIN, C.K., COLLINGTON, G.K., TRABULSI, L.R., KNUTTON, S., 1998, *Increased levels of intracellular calcium are not required for the formation of attaching and effacing lesions by entheropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli.* Inf. and Immunity, **66:** 3900 – 3908.
20. BALISH, E., FILUTOWICZ, H., 1991, *Serum antibody response of gnotobiotic athymic and euthymic mice following alimentary tract colonization and infection with Candida albicans.* Can. J. of Microbiol., **37:** 204 - 210.
21. BALOWS, A.(ed.), 1991, *Manual of Clinical Microbiology.* 5th ed., Amer. Soc. For Microbiology, Washington D.C.
22. BALS, M., 1982, *Laboratorul clinic in infectii*, Editura Medicala, Bucuresti.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

23. BARKI, M., KOLTIN, Y., van WETTER, M., ROSENBERG, M., *A Candida albicans surface antigen mediating adhesion and autoaggregation in Saccharomyces cerevisiae.* Inf. and Immunity, **62:** 4107 - 4111.
24. BARNES, L.M., LO, M.F., ADAMS, M.R., CHAMBERLAIN, H.L., 1999, *Milk and milk proteins prevent bacterial adhesion.* Appl. Environ. Microbiol., **65:** 4543 – 4548.
25. BASARABA, R.J., BYERLY, A.N., STEWART, G.C., MOSIER, D.A., FENWICK, B.W., CHENGAPPA, M.M., LAEGREID, W.W., 1998, *Actin enhances the haemolytic activity of Escherichia coli.* Microbiology, **144:** 1845 - 1852.
26. BAUMLER, A.J., TSOLIS, R.M., HEFFRON, F., 1996, *Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by Salmonella typhimurium.* Inf. and Immunity, **64:** 1862 – 1865.
27. BEACHEY, E.H.(ed.), 1980, *Bacterial adherence: Receptors and recognition.* Series B, vol. 6, Chapman & Hall, London.
28. BEACHEY, E.H., 1981, *Bacterial adherence: adhesin - receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal cells.* J. Inf. Dis., **143:** 325 - 345.
29. BEVERIDGE, T.J., 1993, *Current trends and future prospects in prokariotic envelope research: a microscopist's view.* J. of Appl. Bacteriology Symposium Suppl.: " Microbial cell envelopes: interactions and biofilms" (Quesnel, L.B., Gilbert, P., Handley, Pauline S., eds.), Blackwell Sciet. Public., Oxford., **74:**143S – 154S.
30. BEZIRTZOGLOU, EUGENIA, 1997, *The intestinal microflora during the first weeks of life.* Anaerobe, **3:** 173 – 177.
31. BIBEL, DEBRA JAN, ALY, RAZA, SHINEFIELD, H.R., 1992, *Inhibition of microbial adherence by sphinganine.* Can. J. of Microbiol., **38:** 983 – 985.
32. BLENKINSOPP, S.A., COSTERTON, J.W., 1991, *Understanding bacterial biofilms.* Elsevier Sc. Publish. Ltd. (UK), Tibtech, **9:** 138 – 143.
33. BLOCK, J.-C., 1999, *Adhésion-agrégation des bactéries : comportement individuel ou social ?* Bull. Soc. Fr. Microbiol., **14(1):** 13 – 18.
34. BLOT, F., NITENBERG, G., CHACHATY, ELISABETH, RAYNARD, B., GERMANN, NATHALIE, ANTOUN, S., LAPLANCHE, AGNES, BRUN-BUISSON, C., TANCREDE, C., 1999, *Diagnosis of catheter-related bacteraemia: a prospective comparison of the time to positivity of hub-blood versus peripheral-blood cultures.* The Lancet, **354:** 1071- 1077.
35. BONNER, M.C., TUNNEY, M.M., JONES, D.S., GORMAN, S.P., 1997, *Factors affecting n vitro adherence of ureteral stent biofilm isolates to polyurethan.* Appl. Environ. Microbiol., **61 :** 187 – 193.
36. BOS, R., van der MEI, H.C., BUSSCHER, H.J., 1996, *Influence of ionic strength and substratum hydrophobicity on the co-adhesion of oral microbial pairs.* Microbiology, **142:** 2355 – 2361.
37. BOUGNOUX, M.-E. si colab., 1990, *Comparison of antibody, antigen and metabolite assays for hospitalized pacients with disseminated or peripheral candidiasis.* J. of Clinical of Microbiol., **28:** 905 – 909.
38. BOULLOCHE, J., MOUTERDE, O., MALLET, E., 1994, *Traitement des diarrhées aiguës chez le nourrison et le jeune enfant. Étude contrôlée de l'activité antidiarrhéique de L. acidophilus tués (souche LB), contre un placebo et un médicament de référence (lopéramide).* Annales de Pédiatrie, **41:** 457 – 463.
39. BOUVET, J.P., BELEC, L., PIRES, R., PILLOT, J., 1994, *Immunoglobulin G antibodies in human vaginal secretions after parenteral vaccination.* Inf. and Immunity, **62**: 3957 – 3961.
40. SHANSON, D.C., 1999, *Microbiology Clinical Practice.* Third Ed., Butterworth Heinemann, Oxford.
41. BRANDTZAEG, P., HALSTENSEN, T.S., KETT, K., KRAJCI, P., KVALE, D., ROGNUM, T.O., SCOTT, H., SOLLID, L.M., 1989, *Immunobiology and immunopathology of human gut mucosa: humoral immunity and intraepithelial lymphocytes.* Gastroenterology, **97:** 1562 - 1584. 1
42. BROCK, T.D., MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., PARKER, J.,1994, *Biology of Microorganisms.* Prentice Hall International, Inc., Seventh Ed., New Jersey, p. 402 – 408, 571 - 573.
43. BROWN, M.R.W., GILBERT, P., 1993. *Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents.* J. of Appl. Bacteriology Symposium Suppl.: " Microbial cell envelopes: interactions and biofilms" (Quesnel, L.B., Gilbert, P., Handley, Pauline S., eds.), Blackwell Sciet. Public., Oxford., **74:** 87S – 97S.
44. BUIUC, D., NEGUT, M., 1999, *Tratat de microbiologie clinica.* Editura Medicala, Bucuresti.
45. BUSSCHER, H.J., GEERTSEMA-DOORNBUSCH, G.I., VAN DER MEI, H.C., 1993, *On mechanisms of oral microbial adhesion.* J. of Appl. Bacteriology Symposium Suppl.: " Microbial cell envelopes: interactions and biofilms" (Quesnel, L.B., Gilbert, P., Handley, Pauline S., eds.), Blackwell Sciet. Public., Oxford., **74:** 136S – 142S.
46. BUSSCHER, H.J., BOS, R., van der MEI, H.C., 1995, *Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion.* FEMS Microbiology Letters, **128:** 229 - 234.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

47. CALDERONE, R., ENACHE, ELENA, ESKANDARI, TARA, WADSWORTH, ELSA, STURTEVANT, J., 1996, *Adherence of Candida albicans to mammalian cells in vitro: nutritional influences.* The Abstracts Review of The Third Conference of Cell cultures, Kyoto, Japan, p. 596 – 605.
48. CARBALLO, JULIA, FERREIROS, C., 1992, *Adherencia bacteriana en las infecciones asociadas a dispositivos protésicos implantados.* Cadernos de revision 2, Univ. de Santiago de Compostella, Ed. Servicio de Publicacions e Intercambio Cientifico, p. 9 - 56.
49. CARPENTIER, BRIGITTE, 1999, *Les Biofilms (2).* Bull. Soc. Fr. Microbiol., **14 (2):** 105-111.
50. CERI, H., OLSON, M.E., STREMICK, C., READ,R.R., MORCK, D., BURET, A., 1999, *The Calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms.* J. of Clinical Microbiol., **37:** 1771 – 1776.
51. CHACHATY, E., YOUSSEF, M.T., BOURNEIK, C., ANDREMONT, A., 1995, *Shedding of antibiotic-resistant members of the family Enterobacteriaceae in healthy residents of France and Jordan.* Res. Microbiol., **146:** 175-182.
52. CHAUVIERE, G., COCONNIER, MARIE – HELENE, KERNEIS, SOPHIE, DARFEUILLE-MICHAUD, ARLETTE, JOLY, B., SERVIN, A., 1992, *Competitive exclusion of diarrheagenic Escherichia coli (ETEC)* from *human enterocyte-like Caco-2 cells by heat-killed Lactobacillus.* FEMS Microbiology Letters, **91:** 213 – 218.
53 CHIRICUTA, I. (red.), 1984, *Cancerologie. Vol I Cancerologie generala.* Ed. Medicala, Bucuresti, p. 313, 421-436.
54. CODITA, IRINA, DUMITRESCU, VIORICA, GRIGORE, L., 1997, *Evidentierea producerii de «slime » - marker de patogenitate pentru stafilococii coagulaza negativi.* Bacteriologia, Virusologia, Parazitologia, Epidemiologia, **42 (3):** 155 – 157.
55. COLLE, J.T., SESHAN, K.R., PHANEUF, M., LYNN, K.T., 1991, *Chlamydospore-like cells of Candida albicans in the gastrointestinal tract of infected immunocompromised mice.* Can J. of Microbiol., **37**: 637-646.
56. COLLIER, A.M., 1980, *Attachment of Mycoplasma pneumoniae to respiratory epithelium.* In: "Bacterial adherence: Receptors and recognition"(Beachey, E.H., ed.) . Series B, vol. 6, Chapman & Hall, London, p. 159 – 183.
57. COLLINS, C.H., LYNE, P.M., 1976, *Microbiological Methods*, Laboratory Techniques Series, Butherworths, London.
58. COOGAN, M.M., SWEET, S.P., CHALLACOMBE, S.J., 1994, *Immunoglobulin A (IgA),IgA1 and IgA2 antibodies to Candida albicans in whole and parotid saliva in human immunodeficiency virus infection and AIDS.* Inf. and Immunity, **62:** 892 -896.
59. COSTERTON, J.W., LAPPIN-SCOTT, H.M., 1989, *Behavior of bacteria in biofilms.* ASM News, **55**: 650 - 654.
60. COSTERTON, J.W., LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL, D.E., KORBER, D.R., LAPPIN-SCOTT, H.M., 1995, *Microbial Biofilms* . Ann. Rev. Microbiol., **49 :** 711 -745.
61. CUSHION M.T., 1998, *Taxonomy, genetic organization and life cycle of P. carinii.* Semin. Respir. Infect., 1998, **13**: 304-314.
62. CRAVIOTO, A., GROSS, R.J., SCOTLAND, S.M., ROWE, B., 1979, *An adhesive factor found in strains of Escherichia coli belonging in the traditional infantile enteropathogenic serotypes.* Curr. Microbiol., **3:** 95 – 99.
63. CUNDELL, DIANA R., TUOMANEN, E., 1995, *Attachment and interaction of bacteria at respiratory mucosal surfaces.* In: "Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens. Cap. I. Bacterial adherence, colonization and invasion on mucosal surfaces" (Roth, J.A., Bolin, Carole A., Brogden, Kim A., Minion, F.C., Wannemuehler, M.J., eds.). Sec. Ed., ASM Press, Washington, D.C., p. 3 – 20.
64. DAILEY, M.O., 1993, *The selectin family of cell-adhesion molecules.* In: "Lymphocyte adhesion molecules" (Shimizu, Y., ed.), R.G. Landes Comp., Austin.
65. DAVIES, D.G., CHAKRABARTY, A.M., GEESEY, G.G., 1993, *Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by Pseudomonas aeruginosa.* Applied and Environm. Microbiol., **59:** 1181 - 1186.
66. DAVIES, D.G., PARSEK, M.R., PEARSON, J.P., IGLEWSKI, B.H., COSTERTON, J.W., GREENBERG, E. P., 1998, *The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm.* Science, **280:** 295 – 298.
67. DEITSCH, K.W., MOXON, E.R., WELLEMS, T.E., 1997, *Shared themes of antigenic variation and virulence in bacterial, protozoal and fungal infections.* Microbiol. And Molecular Biology Rev., **61:** 281 – 293.
68. DEBELEAC, LUCIA, POPESCU-DRANDEA, M.C., 1994, *Microbiologie.* Editura Medicala Amaltea, Bucuresti.
69. DELVES, P.J., ROITT, I.M.(eds.), *Encyclopedia of Immunology.* Sec. Ed., Academic Press Inc., San Diego California.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

70. DEMAIN, A.L., DAVIES, J.E. (Eds. in chief), 1999, *Manual of Microbiology and Biotechnology*. Sec. Ed., ASM Press, Washington, D.C.
71. DERETIC, V., SCHURR, M.J., HONGWEI,YU, 1995, *Pseudomonas aeruginosa, mucoidy and the chronic infection phenotype in cystic fibrosis.* Trends in Microbiology, **3:** 351-355.
72. DESLAURIERS, N., MICHAUD,J., CARRÉ, B., LÉVEILLÉ, C., 1996, *Dynamic expression of cell-surface antigens probed with Candida albicans-specific monoclonal antibodies.* Microbiolgy, **142:** 1239 – 1248.
73. DIMA, V.F., PETROVICI, A., DIMA, S.V., 1990, *Characterization of colonization factor antigen CFA/I from an enterotoxigenic Escherichia coli strain (0128:H12).* Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., ***49:*** 297 – 313.
74. DIMARTINO, P., BERTIN, Y., GIRARDEAU, J.P., LIVRELLI, VALERIE, JOLY, B., DARFEUILLE-MICHAUD, ARLETTE, 1995, *Molecular characterization and adhesive properties of CF29K, an adhesin of Klebsiella pneumoniae strains involved in nosocomial infections.* Inf. and Immunity, **63:** 4336 – 4344.
75. DIMARTINO, P., SIROT, D., JOLY, B.,RICH, C., DARFEUILLE-MICHAUD, ARLETTE, 1997, *Relationship between adhesion to intestinal Caco-2 cells and multidrug resistance in Klebsiella pneumoniae clinical isolates.* J. of Clinical Microbiology, **35:** 1499 – 1503.
76. DIXON, B., 2000, *Changing pictures of pathogenicity and virulence.* ASM News, **66:** 2 – 3.
77. DIXON, B., 2000, *The ecology of pathogens.* ASM News, **66:** 122 – 127.
78. DOGARU, G.A., URSEA, N., *Etiopatogenia infectiilor urinare.* Nefrologia, **4 (12):**133 – 151.
79. DOMENICO, P., SALO, R.J., CROSS, A.S., CUNHA, B.A., 1994, *Polysaccharide capsule–mediated resistance to opsonophagocytosis in Klebsiella pneumoniae.* Inf. and Immunity, **62:** 4495 - 4499.
80. DOOLITTLE, M.M., COONEY, J.J., CALDWELL, D.E., 1995, *Lytic infection of Escherichia coli biofilms by bacteriophage T4.* Can. J. of Microbiol., **41:** 12 - 18.
81. DORN, B.R., DUNN Jr., W.A., PROGULSKE-FOX, A., 1999, *Invasion of human coronary artery cells by periodontal pathogens.* Inf. and Immunity, **67:** 5792 – 5798.
82. DOUCET-POPULAIRE, FLORENCE, TRIEU-CUOT, P., ANDREMONT, A., COURVALIN, P., *Conjugal transfer of plasmid DNA from Enterococcus faecalis to Escherichia coli in digestive tracts of gnotobiotic mice.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, **36:** 502 – 504.
83. DOUGLAS, L.J., 1987, *Adhesion to surfaces.* In: "The Yeasts. Vol 2. The yeasts and the environment". (Rose, A.H., Harrison, J.S., eds.). Sec. ed., Acad. Press Inc., London, p. 239-280.
84. DUCA, EUGENIA, DUCA, M., FURTUNESCU, G., 1979, *Microbiologie medicala.* Ed. Did.si Ped., p. 400 – 448.
85. DUCLUZEAU, R., CERF, M., CORTHIER, G., RAMBAUD, J.C., CHAPOY, P., AUJARD, Y., ELMER, G.W., 1989, *Microbial Ecology and Intestinal Infections.* E. Bergogne Berezin (Ed.), Springer - Verlag, Paris, p. 11 - 16.
86. DUGUID, J.P., OLD, D.C., 1980, *Adhesive properties of Enterobacteriaceae.* In: *Bacterial adherence: Receptors and recognition* (Beachey, E.H., ed.). Series B, vol. 6, Chapman and Hall, London, p. 185-217.
87. ENACHE, ELENA, ESKANDARI, TARA, BORJA, LETICIA, WADSWORTH, ELSA, HOXTER, BECKY, CALDERONE, R., 1996, *Candida albicans adherence to a human oesophageal cell line.* Microbiology, **142:** 2741 - 2746.
88. ENER, B., DOUGLAS, L.J., 1992, *Correlation between cell-surface hydriphobicity of Candida albicans adhesion to bucal epithelial cells.* FEMS Microbiology Letters, **99**: 37 - 42.
89. EVANS, G.D., EVANS, D.J., CLEGG,S., PAULEY, J.N., 1979, *Purification and characterization of the CFA/I antigen of enterotoxigenic Escherichia coli.* Inf. and Immunity, **25:** 738.
90. FALK, P.G., HOOPER, LORA V., MIDTVEDT, T., GORDON, J.I., 1998, *Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology.* Microbiology and Molecular Biology Rev., **62:** 1157 – 1170.
91. FALKOW, S., TOMPKINS, LUCY S., 1999, *The application of molecular biology to medical bacteriology: yesterday, today and tomorrow.* ASM News, **65:** 317 – 321.
92. FARINHA, M.A., CONWAY, BD., GLASIER, M.G., ELLERT, N.W., IRVIN,R.T., SHERBURNE, R., PARANCHYCH, W., 1994, *Alteration of the pilin adhesin of Pseudomonas aeruginosa PAO results in normal pilus biogenesis but a loss of adherence to human pneumocyte cells and decreased virulence in mice.* Inf. and Immunity, **62:** 4118 – 4123.
93. FAVREBONTE, S., DARFEUILLEMICHAUD, A., FORESTIER, C., 1995, *Aggregative adherence of Klebsiella pneumoniae to human intestine 407 cells.* Inf. and Immunity, **63:** 1318 – 1328.
94. FIDEL, P.L.Jr., LYNCH, MARIA E., SOBEL, J.D., 1994, *Effects of preinduced Candida – systemic cell-mediated immunity on experimental vaginal candidiasis.* **62:** 1032 – 1038.
95. FILLER, S.G., IBE, B.O., IBRAHIM, A.S., GHANNOUM, M.A., USHA RAJ, J., EDWARDS, J.E., Jr., 1994, Mechanisms by which *Candida albicans* induces *endothelial cell prostaglandin synthesis.* Inf. and Immunity, **62:** 1064 - 1069.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

96. FINKELSTEIN, R.A., 2000, *Personal reflexions on cholera: the impact of serendipity.* ASM News, **66:** 663 – 667.
97. FINLAY, B.B., SIEBERS, ANNETTE, 1995, *Mechanisms of mucosal colonization and penetration by bacterial pathogens.* In: "Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens. Cap.I. Bacterial adherence, colonization and invasion on mucosal surfaces" (Roth, J.A., Bolin, Carole A., Brogden, Kim A., Minion, F.C., Wannemuehler, M.J. eds.). Sec. Ed., ASM Press, Washington, D.C., p.33 – 45.
98. FINLAY, B.B., FALKOW, S, 1997, *Common themes in Microbial Pathogenicity Revisited.* Microbial and Molecular Biology Reviews, **61:** 136 -169.
99. FRANKEL, G., CANDY, D.C.A., EVEREST, P., DOUGAN, G., 1994, *Characterization of the C-terminal domains of intimin-like proteins of enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli, Citrobacter freundii and Hafnia alvei.* Inf. and Immunity, **62:** 1835-1842.
100. FRETER, R., 1980, *Prospects for preventing the association of harmful bacteria with host mucosal surfaces.* In: "Bacterial adherence: Receptors and recognition"(Beachey, E.H., ed.). Series B, vol. 6, Chapman & Hall, London, p. 439 – 458.
101. GABRIEL, M.M., SAWANT, A.D., SIMMONS, R.B., AHEARN, D.G., *Effects of silver on adherence of bacteria to urinary catheters: in vitro studies.* Current Microbiology, **30:** 17 - 22.
102. GALDIEREO, EMILIA, DONNARUMMA, GIOVANNA, de MARTINO, LUISA, MARCATILI, ANTONELLA, CIPOLLARO de l'ERO, GABRIELLA, MERONE, ANGELA, 1994, *Effect of low-nutrient seawater on morphology, chemical composition and virulence of Salmonella typhimurium.* Arch. Microbiol., **162:** 41 – 47.
103. GANDER, SARAH, 1996, *Bacterial biofilms: resistance to antimicrobial agents.* J. of Antimicrobial Chemotherapy, **37:** 1047 – 1050.
104. GATERMANN, S., MEYER, H.-G., 1994, *Staphylococcus saprophyticus hemagglutinin binds fibronectin.* Inf. and Immunity, **62:** 4556 – 4563.
105. GIBBONS, R.J., HOUTE, J., 1980, *Bacterial adherence and the formation of dental plaques.* In: "Bacterial adherence: Receptors and recognition" (Beachey, E.H., ed.). Series B, vol. 6, Chapman and Hall, London, p. 61-104.
106. GILBERT, P., EVANS, D.J., BROWN, M.R.W., 1993, *Formation and dispersal of bacterial biofilms in vivo and in situ.* J. of Appl. Bacteriology Symposium Suppl.: " Microbial cell envelopes: interactions and biofilms" (Quesnel, L.B., Gilbert, P., Handley, Pauline S., eds.), Blackwell Sciet. Public., Oxford., **74:** 67S – 78S.
107. GIRON, J.A., GOMEZ DUARTE, O.G., JARVIS, K.G., KAPER, J.B., 1997, *Longus pilus of enterotoxigenic Escherichia coli and its relatedness to other type- 4 pili – A minireview.* Gene, **192:** 39 – 43.
108. GIUGLIANO, L.G., RIBEIRO, S.T.G., VAINSTEIN, M.H., ULHOA, C.J., 1995, *Free secretory component and lactoferrin of human milk inhibit the adhesion of enterotoxigenic Escherichia coli.* J. Med. Microbiol., **42:** 3-9.
109. GLUSHKA, J., CASSELS, F. J., CARLSON, R.W., van HALBEEK, H., 1992, *Complete structure of the adhesin receptor polysaccharide of Streptococcus oralis ATCC 55229 (Streptococcus sanguis HI).* Biochemistry, **31:** 10741 – 10746.
110. GOMEZ-DUARTE, O.G., KAPER, J.B., 1995, *A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal eaeA expression in enteropathogenic Escherichia coli.* Inf. and Immunity, **63:** 1767 – 1776.
111. GRANATO, DOMINIQUE, PEROTTI, FABIENNE, MASSEREY, ISABELLE, ROUVET, MARTINE, GOLLIARD, MIREILLE, SERVIN, A., BRASSART, DOMINIQUE, *Cell surface-associated lipoteichoic acid acts as an adhesion factor for attachment of Lactobacillus johnsonnii La1 to human enterocyte-like Caco-2 cells.* Appl. and Environ. Microbiol., **65:** 1071 – 1077.
112. GREWAL, J.S., TEWARI, R.P., 1990, *Resistance to metal ions and antibiotics in Escherichia coli isolated from foodstuffs.* J. Med. Microbiol., **32**: 223-226.
113. GRIGORIU, D., DELACRETAZ, I., BORELLI, D., 1986, *Traité de mycologie médicale.* Ed. Roche-Bale, Paris.
114. GROISMAN, E.A., OCHMAN, H., 2000, *The path to Salmonella.* ASM News, **66:** 21 – 26.
115. GOLDSBY, R., KINDT, T.J., OSBORNE, BARBARA A., 2000, *Kuby Immunology.* Fourth Ed., W.H. Freeman & Comp., New York.
116. GOODAY, G.W., 1993, *Cell envelope diversity and dynamics in yeasts and filamentous fungi.* J. of Appl. Bacteriology Symposium Suppl.: " Microbial cell envelopes: interactions and biofilms" (Quesnel, L.B., Gilbert, P., Handley, Pauline S., eds.), Blackwell Sciet. Public., Oxford., **74:** 12S – 20S.
117. GREWAL, J.S., TIWARI, R.P., 1990, *Resistance to metal ions and antibiotics in Escherichia coli isolated from foodstuffs.* J. Med. Microbiol, **32:** 223 – 226.
118. GRISTINA, A.G., 1987, *Biomaterial - Centered infection: microbial adhesion versus tissue integration.* Science, **23:** 1588 - 1595.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

119.HAMADA, S., SLADE, H.D.,1980, *Mechanisms of adherence of Streptococcus mutans to smooth surfaces in vitro.* In: "Bacterial adherence: Receptors and recognition" (Beachey, E.H., ed.). Series B, vol. 6, Chapman and Hall, London, p. 105-135.
120. HAMILTON, W.A., CHARACKLIS, W.G., 1989, *Relative activities of cells in suspension and biofilms.* In: "Structure and function of biofilms" (*1993,* Characklis, W.A., Wielderer, P.A. eds.), Dahlem Konferenzen, p. 199-219.
121.HASLAM, D.B., BOREN, T., FALK, P., IILVER, D., CHOU AMY, XU ZHENG, NORMARK, S., 1994, *The amino-terminal domain oh the P - pilus adhesin determines receptor specificity.* Molecular Microbiology, **14:** 399 - 409.
122.HAWSER, S.P., DOUGLAS, JULIA L., 1994, *Biofilm formation by Candida species on the surface material in vitro.* Inf. and Immunity, **62:** 915 - 921.
123.HAWSER, S.P., BAILIE, G.S., DOUGLAS, JULIA L., 1994, *Production of extracellular matrix by Candida albicans biofilms.* J. Med. Microbiol., **47:** 253 – 256.
124. HAZEN, K.C., 1995, *New and emerging yeast pathogens.* Clinical Microbiology Reviews, **8:** 462 – 468.
125. HAZENBOS, B., WOUTER, L.W., BERNARD, M., VAN'T WOUT , J.W., MOOI, F.R., VAN FURTH, R., 1994, *Virulence factors determine attachment and ingestion of nonopsonized Bordetella pertussis by human monocytes.* Inf. and Immunity, **62:** 4818 - 4824.
126. HECZKO, URSULA, ABE, A., FINLEY, B.B., 2000, *In vivo interactions of rabbit enteropathogenic Escherichia coli O 103 with its host: an electronic microscopic and histopathologic study.* Microbes and Infection, **2:** 5 –16.
127. HEJAZI, A., FALKINER, F.R., 1997, *Serratia marcescens.* J. of Medical Microbiology, **46:** 903 – 912.
128. HELD, T.K., ADAMCZIK, TRAUTMANN, M., CROSS, A.S., 1995, *Effects of MICs and sub-MICs of antibiotics on production of capsular polysaccharide of Klebsiella pneumoniae.* Antimicrobial agents and chemoterapy, **39:** 1093 – 1096.
129. HENDERSON, B., POOLE, S., WILSON, M., 1996, *Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis.* Microbiological Reviews, **60:** 316 – 341.
130. HERLEA, V., LAZAR, V., CANJA, D., 1994, *Yeasts as a Model Eukaryotic Cell-Biotechnological Implications.* Proceeding of the 8th National Symposium of Industrial Microbiology and Biotechnology (Anghel, I., ed.), Bucharest, 103 – 112.
131. HERLEA, VICTORIA, CANJA, DOINA, LAZAR, VERONICA, 1997, *Molecular Taxonomic Studies of Listeria monocytogenes with Practical Applications in Clinical Diagnosis and Epidemiology.* Revue Roumaine de Biologie Tome 42, no. 1-2, p. 43-48.
132. HERLEA, VICTORIA, LAZAR,VERONICA, CIOLAC-RUSSU, ANCA, BULAI, DOINA, 1997, *Studiul frecventei tulpinilor de enterobacterii rezistente la antibiotice la purtatori sanatosi.* Analele Universitatii din Bucuresti, Sectia Biologie, XLVI: 57 – 62.
133. HERLEA, VICTORIA, 1998, *Microbiologie generala.* Editura Universitatii din Bucuresti, Bucuresti.
134. HOCINI, H., ISCAKI, S., BOUVET, J.P., PILLOT, J., 1993, *Unexpectedly high levels of some presumably protective secretory immunoglobulin A antibodies to dental plaque bacteria in salivas of both caries-resistant and caries - susceptible subjects.* Inf. and Immunity, **61**: 3597 – 3604.
135. HOLT, J. G., KRIEG, N. R., SNEATH, P. H. A., STALEY, J. T., WILLIAMS, S. T., 1994, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* Ninth Ed., Williams & Wilkins, Baltimore, p.175 - 252.
136.HOSCHUTZKY, H., LOTTSPEICH, F., JANN, K., 1989, *Isolation and characterization of the α-galactosyl-1,4- β-galactosyl – specific adhesin (P adhesin) from fimbriated Escherichia coli.* Inf. and Immunity, **57:** 76 – 81.
137.HOWARD, D.H., 1999, *Acquisition, transport and storage of iron by pathogenic fungi.* Clinical Microbiology Reviews, **12:** 394 - 404.
138.HOYLE, B., 2000, *Colonization-resistant polymer helps battle catheter-related infections.* ASM News, **66:** 131 – 132.
139.HUDSON, BARBARA, K., SHERWOOD, LINDA, 1997, *Explorations in microbiology – A discovery-based approach.* Prentice Hall, New Jersey, p. 228 – 235.
140.HURLEY, ROSALINDE, de LOUVOIS, J., MULHALL, A., 1987, *Yeasts as human and animal pathogens.* In: "The yeasts. Vol. 1. Biology of yeasts" (Rose, A.H., Harrison, J.S., eds.), Sec. ed., Academic Press Inc., London, p. 207 – 281.
141.ISCAKI, S., BOUVET, J.P., 1993, *Human secretory immunoglobulin A and its role in mucosal defence.* Bull. Inst. Pasteur, **91:** 203 - 224.
142.ISRAIL, ANCA-MICHAELA, BALOTESCU, CARMEN, 2000, *Virulence factors in Vibrio cholerae non-O1 and O1 strains isolated in Romania during cholera epidemics between 1990 – 1995.* Abstract Review of 25th SOMED Congress of Microbial Ecology and Disease, Bucharest, 29 Sept. -1Oct., p. 48.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

143. JAMES, W.D., ROTH, R.R., 1992, *Skin Microbiology.* In: "Encyclopedia of Microbiology" (Lederberg, J., ed.).Academic Press, Inc., San Diego, p. 23 - 32.
144. JANDA, M.J., ABBOTT, SHARON L., WOODWARD, D., KHASHE, S., 1998, *Invasion of HEp-2 and other eukaryotic cell lines by providenciae: further evidence supporting the role of Providencia alcalifaciens in bacterial gastroenteritis.* Current Microbiology, **37:** 159 – 165.
145. JARLIER, V., CATTOEN, C., 1998, *Ecologie microbienne hospitalière.* Bull. Soc. Franc. Microbiol., **13 (3) :** 283.
146. JENQ, W., CHEN, C.L., CHANG, C., CRANG, R.F.E., 1994, *Characterization of a major cell wall antigen and potential adhesin in three strains of Candida albicans.* Arch. Microbiol., **162:** 33 - 40.
147. JOHNSON, B.F., 1989, *Use of electron microscopy to characterize the surfaces of flocculent and nonflocculent yeasts cells.* Can. J. of Microbiol., **35:** 1081-1086.
148. JONES, G.W., *The adhesive properties of Vibrio cholerae and other Vibrio species.* In: "Bacterial adherence: Receptors and recognition"(Beachey, E.H., ed.) . Series B, vol. 6, Chapman & Hall, London, p. 219 –249.
149. JONES, G.W., CLEWELL, D.B., CHARLES, L.G.,VICKERMAN, M.M.,1996, *Multiple phase variation in haemolytic, adhesive and antigenic properties of Streptococcus gordonii.* Microbiology , **142:** 181- 189.
150. JOHNSON, T.R., CASE, CHRISTINE, L., 1998, *Laboratory Experiments in Microbiology*, Benjamin/ Cummings Publ. Comp.
151. JULIEN, R., CENATIEMPO, Y. (red.), *Biotechnologies d'aujourd'hui – Dix domaines stratégiques à l'aube du troisième millénaire.* Pulim Presses de l'Université de Limoges.
152. KARABINIS, A., HILL, C., LECLERCQ, B., TANCREDE, C., BAUME, D., ANDREMONT,A., 1988, *Risk factors for candidemia in cancer pacients: a case-control study.* J.of Clin. Microbiol., **26:**426–432.
153. KIL, K.S., DAROUICHE, R.O., HULL, R.A., MANSOURI, M.D., MUSHER, D.M., 1997, *Identification of a Klebsiella pneumoniae strain associated with nosocomial urinary tract infection.* J. of Clinical Microbiology, **35:** 2370 – 2374.
154. KLOTZ, S.A., HEIM, R.C., SMITH, R.L., ROUSE, J.B., 1994, *The fibronectin adhesion of Candida albicans.* Inf. and Immunity, **62:** 4679 - 4681.
155. KNUDSEN, T.B., KLEMM, P., 1998, *Probing the receptor recognition site of the FimH adhesin by fimbriae – displayed FimH-Foc-H hybrids.* Microbiology, **144:** 1919-1929.
156. KNUTTON, S., BALDINI, MARY M., KAPER, J.B., McNEISH,A.S., 1987, *Role of plasmid-encoded adherence factors in adhesion of enteropathogenic Escherichia coli to HEp-2 cells.* Inf. and Immunity, **55:** 78 – 85.
157. KNUTTON, S., ADU-BOBIE, JEANNETTE, BAIN, C., PHILLIPS, A.D., DOUGAN, G., FRANKEL, G., 1997, *Down regulation of intimin expression during attaching and effacing enteropathogenic Escherichia coli adhesion.* Inf. and Immunity, **65 :** 1644 - 1652.
158. KOBAYASHI, HIDEMITSU si colab., 1994, *Structural modification of cell wall mannans of Candida albicans serotype A strains grown in yeast extract - Sabouraud liquid medium under acidic conditions.* Infection and Immunity, **62:** 968 - 973.
159. KOLENBRANDER, P.E., LONDON, J., 1993, *Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence.* J. of Bacteriology, **175:** 3247 – 3252.
160. KOLENBRANDER, P.E., 1993, *Coaggregation of human oral bacteria: potential role in the accretion of dental plaque.* J. of Appl. Bacteriology Symposium Suppl.: " Microbial cell envelopes: interactions and biofilms" (Quesnel, L.B., Gilbert, P., Handley, Pauline S., eds.), Blackwell Sciet. Public., Oxford., **74:** 79S – 86S.
161. KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., JANDA, W.A., SCHRECKENBERGER, WINN, Jr., W. C., 1997, *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology.* Fifth Ed.,Lippincott, Philadelphia, p.171 – 252.
162. KOOYK, YVETTE van, FIDGOR, C.G., 1993, *Integrins and integrin regulation.* In: "Lymphocyte adhesion molecules" (Shimizu, Y., ed.). R.G. Landes Comp., Austin, p. 1 - 25.
163. KOZEL, T., 1995, *Virulence factors of Cryptococcus neoformans.* Trends in Microbiology, **3:** 295 – 299.
164. KRAUSE, U., THOMSON-CARTER, FIONA M., PENNINGTON, H.T., 1996, *Molecular epidemiology of Escherichia coli O157:H7 by pulsed-field gel electrophoresis and comparison with that by bacteriophage typing.* J. of Clin. Microbiol, **34:** 959-961.
165. KRIEG, N.R. (ed. vol. 1), HOLT, J.G. (ed. in chief), 1984, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Williams & Wilkins, Baltimore.
166. KRUSE, HILDE, SORUM, H., 1994, *Transfer of Multiple Drug Resistance Plasmids between Bacteria of Diverse Origins in Natural Microenvironments.* Appl. Environ. Microbiol., **60**: 4015- 4021.
167. KURAMITSU, H.K., WONDRACK, LILLIAN, 1983, *Insoluble glucan by Sreptococcus mutans serotype C strains.* Inf. and Immunity, **42:** 773 – 770.
168. LAZAR, VERONICA, HERLEA, VICTORIA, CANJA, DOINA, 1996, *The influence of antibiotics on in vivo*

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

adherence capacity of opportunistic bacteria at inert materials used in stomatology. Abstract Review of XXIst SOMED Congress, Paris, France, 28 - 30 oct. 1996, p. 126.
169. LAZAR, VERONICA, 1997, *Influence of antibiotics on in vitro adherence capacity of some E.coli strains at inert material of catheters.* Bioscience and Microflora (Supplement), Japan Bifidus Foundation, vol **16 (2)**: 20.
170. LAZAR, V., HERLEA, V., BULAI, D., CIOLAC-RUSSU, A., 1998, *Studiul frecventei tulpinilor de enterobacterii rezistente la antibiotice la bolnavi spitalizati.* Analele Universitătii din Bucuresti, Sectia Biologie, XLVII, p. 69-78.
171. LAZAR, VERONICA, BULAI, DOINA, LOGOJAN, ANAMARIA, BALOTESCU, CARMEN, MORARU, ANCA, HERLEA, VICTORIA, 1998, *The influence of certain environmental factors on* in vitro *adherence capacity at inert material of catheters of some E. coli strains.* Abstract Review of 2nd World Congress of Anaerobic Bacteria and Infections, Nice, France, 3 - 6 oct. 1998, p. 18.
172. LAZAR, VERONICA, 1999, *Study of the adhesion and invasion capacity of some opportunistic enterobacteria strains to Caco-2 cell line.* Abstract Review of 24th SOMED Congress of Microbial Ecology and Disease, San Francisco U.S.A., 23 - 25 sept. 1999, p. 48.
173. LAZAR, V., HERLEA, V., BULAI, D., CIOLAC-RUSSU, A., MORARU, A., CERNAT, R., VADINEANU, E.,1999, *A comparative study of the frequency of enterobacteria strains showing drug resistance from healthy and hospitalized people.* Abstract Review of 24th SOMED Congress of Microbial Ecology and Disease, San Francisco, U.S.A., 23 - 25 sept. 1999, p. 49.
174. LAZAR, VERONICA, 1999, *A quantitative method to determine the adhesion and invasion capacity of some opportunistic enterobacteria strains to an intestinal cell line.* Analele Universitatii din Bucuresti, Sectia Biologie, XLVIII (sub tipar).
175. LAZAR, VERONICA, HERLEA, VICTORIA, BULAI, DOINA, CIOLAC-RUSSU, ANCA, CERNAT, RAMONA, 1999, *Some aspects related with health risk for human carriers of antibiotic resistant enterobacteria strains.* Analele Universitatii din Bucuresti, Sectia Biologie, XLVIII (under press).
176. LAZAR, VERONICA, IONESCU, D. M., DIMA, V.F., HERLEA, VICTORIA, COMAN, NICULINA, NITU, GEORGETA, ZARNEA, G., 2000, *Ultrastructural aspects of the interaction between some opportunistic enterobacteria strains selected for adhesive properties on a cellular substratum and the peritoneal rat macrophages.* Abstract Review of 25th SOMED Congress of Microbial Ecology and Disease, Bucharest, 29 Sept. - 1Oct., p. 37.
177. LAZAR, VERONICA, BEZIRTZOGLOU, EUGENIA, HERLEA, VICTORIA, IONESCU, D.M., PETRASINCU, DOINA, TATU, DORINA, CERNAT, RAMONA, 2000, *Characterization of the interaction of some opportunistic adherent enterobacteria strains with HEp-2 cells - ultrastructural aspects.* Abstract Review of 25th SOMED Congress of Microbial Ecology and Disease, Bucharest, 29 Sept. -1Oct., p. 38.
178. LAZAR, VERONICA, BEZIRTZOGLOU, EUGENIA, HERLEA, VICTORIA, PETRASINCU, DOINA, MORARU, ANCA, BULAI, DOINA, ILINA, LUCIA, TACHE, ELENA, 2000, *Influence of anaerobic bacteria on the adhesion and invasion capacity of some E. coli strains to cellular substrata.* Abstract Review of 25th SOMED Congress of Microbial Ecology and Disease, Bucharest, 29 Sept. -1Oct., p. 39.
179. LAZAR, VERONICA, 2000, *Implicatii teoretice si practice ale fenomenelor de aderenta si agregare microbiana* (Teza de doctorat - Academia Româna. Institutul de Biologie Bucuresti), Bucuresti.
180. LANDRAUD, L., GAUTHIER, M., FOSSE, T., BOQUET, P., 2000, *Frequency of Escherichia coli strains producing the cytotoxic necrotizing factor (cnf1) in nosocomial urinary tract infections.* Letters in Appl. Microbiol., **30:** 213 – 216.
181. LANNE, B., CIOPRAGA, JEANA, BERGSTRÖM, J., MOTAS, CECILIA, KARLSSON, K.-A., 1994, *Binding of the galactose-specific Pseudomonas aeruginosa lectin, PA-I, to glycosphingolipids and others glycoconjugates.* Glycoconjugate Journal, **11:** 292 – 298.
182. LANGERMANN, S., PALASZYNSKI,S., BARNHART, M., AUGUSTE, G., PINKNER, J.S., BURLEIN, J., BARREN, P., KOENIG, S., LEATH, S., JONES, C.H., HULTGREN, S.J., 1997, *Prevention of mucosal Escherichia coli infection by FimH – adhesin - based systemic vaccination.* Science, **276:** 607 – 611.
183. LAW, D., 1994, *Adhesion and its role in the virulence of enteropathogenic Escherichia coli.* Clinical Microbiol. Rev., **7:** 152 – 173.
184. LAW, D., CHART, H., 1998, *Enteroaggregative Escherichia coli.* J. of in Appl. Microbiol., **84:** 685 – 697.
185. LAW, D., 2000, *A review: virulence factors of Escherichia coli O157 and other Shiga toxin-producing E. coli.*J. of Appl. Microbiol., **88:** 729 - 745.
186. LEDERBERG, J. (ed.), 1992, *Encyclopedia of Microbiology.* Academic Press Inc., San Diego, California.
187. LEE, J.C., KING, R., 1983, *Adherence mechanisms of Candida albicans.* In: "Microbiology – 1983 – Mechanisms of pathogenesis". (Schlessinger, D., ed.), Amer. Soc. for Microbiol., Washington. D.C., p. 269 – 272.
188. LEVINE, M.M., PRADO, VALERIA, ROBINS-BROWNE, R., LIOR, H., KAPER, J.B., MOSELEY, S.L.,

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

GICQUELAIS, KAREN, NATARO, J.P., VIAL, P., TALL, B., 1988, *Use of DNA probes and HEp-2 cell adherence assay to detect diarrheagenic Escherichia coli.* J. of Inf. Diseases, **158:** 224 - 228.
189. LEVINSON, W., JAWETZ, E., *Medical Microbiology and Immunology.* Sixth. Ed., McGraw Hill Comp., Inc., New –York.
190. LEVY, S.B., 1992, *The antibiotic paradox: How miracle drugs are destroying the miracle.* Ed. Planum Press, N.Y., p. 53-104.
191. LIVRELLI, VALERIE, DE CHAMPS, C., DI MARTINO, P., DARFEUILLE-MICHAUD, ARLETTE, FORESTIER, CHRISTIANE, JOLY, B., 1996, *Adhesive properties and antibiotic resistance of Klebsiella, Enterobacter and Serratia clinical isolates involved in nosocomial infections.* J. of Clin. Microbiol., **34:** 1963 – 1969.
192. LOPEZ-RIBOT, J.-L., La JEAN CHAFFIN, W., 1994, *Binding of extracellular matrix component entactin to Candida albicans.* Inf. and Immunity, **62:** 4564 - 4571.
193. LOPEZ-RIBOT, J.-L., Mc VAY, C.S., La JEAN CHAFFIN, W., 1994, *Murine tissues exposed to cytotoxic drugs display altered patterns of Candida albicans adhesion.* Inf. and Immunity, **62:** 4226 - 4232.
194. LOOMIS, W.F., 1983, *Genetic analysis of cell adhesion.* Developmental Genetics, **4:** 61 – 68.
195. MADISON, BERENEICE, OFEK, I., CLEGG, S., ABRAHAM, S.N., 1994, *Type 1 fibrial shafts of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae influence sugars - binding specificities of their FimH adhesins.* Inf. and Immunity, **62:** 843 – 848.
196. MAKIN, S.A., BEVERIDGE, T.G., 1996, *The influence of A-band and B-band lipopolysaccharide on the surface characteristics and adhesion of Pseudomonas aeruginosa to surfaces.* Microbiology, **142:** 299 - 307.
197. MANEFIELD, M., de NYS, R., KUMAR, N., READ, R., GIVSKOV, M., STEINBERG, P., KJELLEBERG, S., 1999, *Evidence that halogenated furanones from Delisea pulchra inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein.* Microbiology, **145:** 283 – 291.
198. MANJAREZ-HERNANDEZ, H.A., BALDWIN, T.J., WILLIAMS, P.H., HAIGH, R., KNUTTON, S., AITKEN, A., 1996, *Phosphorylation of myosin light chain at distinct sites and its association with the cytoskeleton during enteropathogenic Escherichia coli infection.* Inf. and Immunity, **64:** 2368 – 2370.
199. MARCHESE, A., DEBBIA, E.A., MASSARO, S., CAMPORA, U., SCHITO, G., 1996, *Brodimoprim effects of subliminal inhibitory concentrations on virulence traits of respiratory and urinary tract pathogens and on plasmid transfer and stability.* J. of Chemotherapy, **8:** 171 – 177.
200. MARCUS, HILDA, AUSTRIA, AL, BAKER, N.R., 1989, *Adherence of Pseudomonas aeruginosa to tracheal epithelium.* Inf. and Immunity, **57:** 1050 - 1053.
201. MARSHALL, K.C., 1984, *Microbial adhesion and aggregation.* Springer Verlag, Berlin.
202. MATHEWSON, J.J., OBERHELMAN, R.A., DUPONT, H.L., De La CABADA, J., GARIBAY, E.V., 1987, *Enteroadherent Escherichia coli as a cause of diarrhea among children in Mexico.*J. of Clin. Microbiol., **25:** 1917 – 1919.
203. MATTHEWS, K.R., MURDOUGH, P.A., BRAMLEY, A.J., 1997, *Invasion of bovine epithelial cells by verocytotoxin-producing Escherichia coli O157:H7.* J. of Appl. Microbiology, **82:** 197 – 203.
204. McCOURTIE, JANE, DOUGLAS, JULIA L., 1981, *Relationship between cell surface composition of Candida albicans and adherence to acrylic after growth on different carbon sources.* Inf. and Immunity, **32:** 1234 – 1241.
205. Mc FARLAND, L.V., 1993, *Biotherapeutic agents: boon or bane?* Soc. for Microbial Ecology and Disease, Annual Meeting, Boston, U.S.A. (Abstracts book), p. 38.
206. Mc GROARTIE, J.A., 1993, *In vitro inhibition of growth and adhesion of Candida albicans by vaginal isolates lactobacilli.* Soc. for Microbial Ecology and Disease, Annual Meeting, Boston, U.S.A. (Abstracts book), p.39.
207. MENDONCA, AUBREY F., AMOROSO, T.L., KNABEL, S.J., 1994, *Destruction of Gram-negative food-borne pathogens by high pH involves disruption of the cytoplasmic membrane.* Appl. and Environ. Microbiol., **60:** 4009 – 4014.
208. MEYER, D.H., FIVES-TAYLOR, P.M., 1994, *Characteristics of adherence of Actinobacillus actinomycetemcomitans to epithelial cells.* Inf. and Immunity, **62:** 928 - 935.
209. McGINNIS, M.R., 1980, *Laboratory handbook of medical micology.* Academic Press, Inc., New York.
210. MICHALEK, SUZANNE M., CHILDERS, N.K., DERTZBAUGH, M.T., 1995, *Vaccination strategies for mucosal pathogens.* In: "Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens. Cap. V. Strategies to overcome bacterial virulence mechanisms" (Roth, J.A., Bolin, Carole A., Brogden, Kim A., Minion, F.C., Wannemuehler, M.J. eds.). Sec. Ed., ASM Press, Washington, D.C., 269-301.
211. MIMS, C.A., PLAYFAIR, J.H.L., ROITT, I.M., WAKELIN, D., WILLIAMS, ROSAMUND, 1998, *Medical Microbiology.* Sec. Ed., Mosby International Limited, London.
212. MINTZ, K.P., FIVES-TAYLOR, PAULA M., 1994, *Adhesion of Actinobacillus actinomycetemcomitans to a*

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

human oral cell line. Inf. and Immunity. **62:** 3672 – 3678.
213. MOBLEY, H. L.T., 2000, *Escherichia coli and Proteus mirabilis exhibit distinct mechanisms of pathogenesis when causing urinary tract infections.* ASM News, **66:** 403 – 410.
214. MOORE, W.E.C., MOORE, LILLIAN H., 1995, *IntestinalFloras of Populations That Have a High Risk of Colon Cancer.* Appl. and Environ. Microbiology, **61:** 3202 – 3207.
215. MOUTON,C., BILAK, R., MICHAILESCO, P., VALCARCEL, J., 1999, *Les biofilms bactériens de la cavité buccale.* In : « Les biofilms (2)». Bull. Soc. Fr. Microbiol., **14:** 112-120.
216. MOYEN, E.N., BONNEVILLE, F., FAUCHERE, J.L., 1986, *Modification par l'érythromycine et un extrait de Lactobacillus acidophilus de la colonisation de l'intestin et de la translocation de Campylobacter jejuni chez le souris axénique.* Ann. Inst. Pasteur - Microbiologie. **137 A:** 199 - 207.
217. MüHLDORFER, INGE, HACKER, J.,1994, *Genetic aspects of Escherichia coli virulence.* Microbial Pathogenesis, **16 :** 171 - 181.
218. MUNDY, L.M., SAHM, D.F., GILMORE, M., 2000, *Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance.* Clinical Microbiol. Rev., **13:** 513-522.
219. MURRAY, P.R.,1998, *Pocket Guide to Clinical Microbiology.* 2nd ed., ASM Press, Washington, D.C.
220. NATARO, J.P., KAPER, J.B., 1998, *Diarrheagenic Escherichia coli.* Clin. Microbiol.Reviews, **11:** 142 – 201.
221. NEGUT, M., BUIUC, D., 1999, *Identificarea bacililor gram-negativi aerobi glucozofermentativi.* In: « *Tratat de microbiologie clinica* » (Buiuc, D., Negut, M., red.), Editura Medicala, Bucuresti, p. 698 – 757.
222. NEU, T.R., 1996, *Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces.* Microbiological Reviews, **60:** 151-166.
223. NICHOLS, W.W., 1989, *Susceptibility of biofilms to toxic compounds.* In: "Structure and function of biofilms" (Characklis, W.G., Wilderer, P.A., eds.), John Wiley & Sons Ltd., Dahlem Konferenzen, p. 321 - 331.
224. NICOLETTI, M., SUPERTI, FABIANA, CONTI, CINZIA, CALCONI, A., ZAGAGLIA,C., 1988, *Virulence factors of lactose-negative Escherichia coli strains isolated from children with diarrhea in Somalia.* J. Clin. Microbiol., **26:** 524 – 529.
225. NIEDERMAN, M.S.,1989, *Bacterial adherence as a mechanism of airway colonization.*Eur. J. Microbiol. Infect. Dis., **8:** 15-20.
226. NOVEL, G., 1999, *Les Biofilms* (2). Bull. Soc. Fr. Microbiol., **14 (2):** 103-126.
227. ODDS, F.C., 1994, *Candida species and virulence.* ASM News, **60:** 313-318.
228. OFEK, I., BEACHEY, E.H., 1980, *General concepts and principles of bacterial adherence in animals and man.* In: "Bacterial adherence: Receptors and recognition" (Beachey, E.H., ed.). Series B, vol. 6, Chapman & Hall, London, p. 1-29.
229. OFEK, I., DOYLE, R.J., 1994, *Bacterial adhesion to cells and tissues.* Chapman and Hall, Inc., New-York.
230. OGAWA, T., 1994, *The potential protective immune responses to synthetic peptides containing conserved epitopes of Porphyromonas gingivalis fimbrial protein.* J. Med. Microbiol., **41:** 349 - 358.
231. OLSEN, A., YONSSON, ANNA, NORMAK, S., 1989, *Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on Escherichia coli.* Nature, London, **338:** 652 –655.
232. *** *The Oxoid Manual of Culture Media, Ingredients and other Laboratory Services.* Fifth ed. (1982), Publ. by Oxoid Ltd., U.K.
233. PALENIK, B., BLOCK, J.-C., BURNS, R.-G., CHARACKLIS, W.G., CHRISTENSEN, B.E., GHIORSE, W.G., GRISTINA, A.G., MOREL, F.M.M., NICHOLS, W.W., TUOVINEN, O.H., TUSCHEWITZKI, G.-J., VIDELA, H.A., 1993, *Biofilms: properties and processes.* In: "Structure and function of biofilms" (Characklis, W.G., Wilderer, P.A., eds.). John Wiley & Sons Ltd., Dahlem Conferenzen, p. 351 – 366.
234. PASSADOR, L., IGLEWSKI, BARBARA, 1995, *Quorum sensing and virulence gene regulation in Pseudomonas aeruginosa.* In: "Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens. Cap. II. Bacterial adaptation to extracellular environments" (Roth, J.A., Bolin, Carole A., Brogden, Kim A., Minion, F.C., Wannemuehler, M.J. eds.). Sec. Ed., ASM Press, Washington, D.C., p. 65 – 78.
235.PATRICK, S., LARKIN, M.J., 1995, *Immunological and molecular aspects of bacterial virulence.* John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England.
236. PECQUET, S, GUILLAUMIN, D., TANCREDE, C., ANDREMONT, A., 1991, *Kinetics of Saccharomyces cerevisiae elimination from the intestines of human volunteers and effect of this yeast on resistance to microbial colonization in gnotobiotic mice.* Appl. and Environ. Microbiol., **57:** 3049-3051.
237. PEARCE, W.A., BUCHANAN, T.M., 1980, *Structure and cell membrane-binding properties of bacterial fimbriae.* In: "Bacterial adherence: Receptors and recognition" (Beachey, E.H., ed.). Series B, vol. 6, Chapman & Hall, London, p. 289 – 344.
238. PEITZ, U., MALFERTHEINER, P., 1999, *Helicobacter pylori infection.* Karger Gazette, No. **63:** 1 – 4.
239. PETER, J., 1996, *Use and Interpretation Tests in Infectious Disease.* Fourth Edition, Specialty Laboratories, Santa Monica, p. 332-334.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

240. PETIT, LAETITIA, GILBERT, MARYSE, POPOFF, M.R., 1999, *Clostridium perfringens: toxinotype and genotype.* Trends in Microbiology, **7:** 104 – 110.
241. PHILLIPS, D.R., GARTNER, T.K., 1980, *Cell recognition systems in eukaryotic cells.* In: "Bacterial adherence: Receptors and recognition"(Beachey, E.H., ed.). Series B. vol. 6. Chapman & Hall. London. p. 399 – 438.
242. PICARDEAU, M., VINCENT, VERONIQUE, 1998, *Mycobacterial linear plasmids have an invertron-like structure related to other linear replicons in actinomycetes.* Microbiology, **144:** 1981 – 1988.
243. PIER, G.B., Des JARDIN, D., GROUT, M., GARNER, C., BENNETT, S.E., PEKOE, G., FULLER, S.A., THORNTON, M.O., HARKONEN, S.W., MILLER, C.H., 1994, *Human immune response to Pseudomonas aeruginosa mucoid exopolisaccharide (alginate) vaccine.* Inf. and Immunity, **62:** 3972 - 3979.
244. POINDEXTER, JEANNE S., 1987, *Bacterial responses to nutrient limitation.* In: "Ecology of Microbial Communities" (Fletcher, M., Gray, T.R.G., Jones, J.G., eds.), The 41th Symposium of The Society for General Microbiology, Cambridge Univ. Press, Cambridge, p.283 – 317.
245. POSTNOVA, TATYANA, GOMEZ-DUARTE, O.G., RICHARDSON, KATHLEEN, 1996, *Motility mutants of Vibrio cholerae O1 have reduced adherence in vitro to human small intestinal epithelial cells as demonstrated by ELISA.* Microbiology, **142:** 2767 – 2776.
246. POXTON, I.R., 1993, *Prokariote envelope diversity.* J. of Appl. Bacteriology Symposium Suppl.: " Microbial cell envelopes: interactions and biofilms" (Quesnel, L.B., Gilbert, P., Handley, Pauline S., eds.), Blackwell Sciet. Public., Oxford., **74:** 1S – 11S.
247. PRIGENT-COMBARET, CLAIRE, LEJEUNE, P., 1999, *La génétique de la formation du developpement des biofilms.* In : « Les biofilms (2) », Bull. Soc. Fr. Microbiol., **14:** 121-126.
248. QUESNEL, L.B., GILBRT, P., HANDLEY, PAULINE S. (eds.), 1993, *Microbial cell envelopes: interactions and biofilms.* Soc. for Applied Bacteriology Symposium. Suppl. to J. of Appl. Bacteriology 74, Blackwell Sciet. Public., Oxford.
249. RAIBAUD, P., DUCLUZEAU, R., TANCREDE, C., 1977, *L'effet de barrière microbienne dans le tube digestif: Moyen de défence de l'hôte contre les bactéries exogènes.* Medecine et Maladies Infectieuses, **7:** 130-134.
250. RAUTELIN, H., KIHLSTROM, E., JURSTRAND, MARGARETHA, DANIELSSON, D., 1995, *Adhesion to and invasion of HeLa cells by Helicobacter pylori.* Zbl. Bakt., **282:** 50-53.
251. REID,G., SOBEL,J.D., 1987, *Bacterial adherence in the pathogenesis of urinary tract infection: a review.* Reviews of Inf. Diseases, **9:** 470 – 487.
252. REINHEIMER,J.A., DEMKOW,M.R., CANDIOTI,M.C., 1990, *Inhibition of coliform bacteria by lactic cultures.* The Australian J. of Dairy Technology, May, 5 –8.
253. *** REMEL Product Technical Manual, 1993, Edited by Remel Concern, Lenexa, Kansas.
254. RIPPON, J.W., 1982, *Medical micology: The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes.* Sec. ed., W.B. Saunders Comp., Philadelphia.
255. RITTIG, M.G., SCHROPPEL,, K., SEACK, K.-H., SANDER, U., N'DIAYE, E.-N., PARINI-MARIDONNEAU, I., SOLBACH, W., BOGDAN, C., 1998, *Coiling phagocytosis of trypanosomatids and fungal cells.*, Inf. and Immunity, **66:** 4331 – 4339.
256. RITTMAN, B.E., 1993, *Detachment from biofilms.* In: "Structure and function of biofilms" (Characklis, W.G., Wilderer, P.A., eds.), John Wiley & Sons Ltd., Dahlem Conferenzen, p. 49 – 58.
257. ROBINSON, A., MELING, J., 1993, *Envelope structure and the development of new vaccines.* J. of Appl. Bacteriology Symposium Suppl.: " Microbial cell envelopes: interactions and biofilms" (Quesnel, L.B., Gilbert, P., Handley, Pauline S., eds.), Blackwell Sciet. Public., Oxford., **74:** 43S – 51S.
258. ROGERS, JULIE, DOWSETT, A.B., DENNIS, P.J., LEE, J.V., KEEVIL, C.W.,,1994, *Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of Legionella pneumophila in a model potable water system containing complex microbial flora.* Appl. and Environ. Microbiol. **60:** 1585 – 1592.
259. ROITT, I.M., 1991, *Essential Immunology.* Sec. ed., Blackwell, Scient. Publ., Oxford. 2 64.
260. ROMLING, UTE, BIAN, Z., HAMMAR, M., SIERRALTA, W.D., NORMARK, S., 1998, *Curli fibers are highly conserved between Salmonella typhimurium and Escherichia coli with respect to operon structure and regulation.* J. of Bacteriology, **180:** 722 – 731.
261. ROSE, A.H., HARRISON, J.S. (Eds.), 1987, *The Yeasts.* Sec.Ed., Acad. Press. Inc., London.
262. ROSENBERG, E., 1993, *Biofilms on water-insoluble substrates.* In: "Structure and function of biofilms" (Characklis, W.G., Wilderer, P.A., eds.), John Wiley & Sons Ltd., Dahlem Konferenzen, p. 59 – 71.
263. ROSENSHINE, I., RUSCHKOWSKI, SHARON, FINLAY, B.B., 1996, *Expression of attaching/effacing activity by enteropathogenic Escherichia coli depends on growth phase, temperature and protein synthesis upon contact with epithelial cells.* Inf. and Immunity, **64:** 966 – 973.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

264. ROTH, J.A., BOLIN, CAROLE A., BROGDEN, KIM A., MINION, F.C., WANNEMUEHLER, M.J. (eds), 1995, *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens* . Sec. Ed., ASM Press, Washington, D.C.
265. ROTROSEN, D., CALDERONE, R.A., EDWARDS Jr., J.E., 1986, *Adherence of Candida species to host tissues and plastic surfaces.* Reviews of Inf. Diseases, **8:** 73-85.
266. RUSSO, T.A., WENDEROTH, SUZANNE, CARLINO, U.B., MERRICK, J.M., LESSE, A.,1998, *Identification, genomic organization and analysis of the group III capsular polysaccharide genes kpsD, kpsM, kpsT, and kpsE from an extraintestinal isolate of Escherichia coli (CP9, O4/K54/H5).* J. of Bacteriology, **180:** 338 – 349.
267. SALAM KHAN, A., SCHIFFERLI, D.M., 1994, *A minor 987P protein different from the structural fimbrial subunit is the adhesin.* Inf. and Immunity, **62:** 4233 – 4243.
268. SALIT, I., VAVOUGIOUS, J., HOFMANN, T., 1983, *Isolation and characterization of Escherichia coli pili from diverse clinical sources.* Inf. and Immunity, **42:** 755– 762.
269. SALYERS, ABIGAIL, WHITT, DIXIE, 1994, *Bacterial pathogenesis – a molecular Approach.* ASM Press, Washington, D.C., p. 190 – 204.
270. SAMARANAYAKE, Y.H., SAMARANAYAKE, L.P., 1994, *Candida krusei: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen.* J. Med. Microbiol., **41:** 295-310.
271. SAMARANAYAKE, Y.H., WU, P.C., SAMARANAYAKE, L.P., SO, M., YUEN, K.J., 1994, *Adhesion and colonization of Candida krusei on host surfaces.* J. Med. Microbiol., **41:** 251 - 258.
272. SAUNDERS, J.R., O'SULLIVAN, HELEN, WAKEMAN, JANE, SIMS, GAIL, HART,C.A., VIRJI, M., HECKELS, J.E., WINSTANLEY, C., MORGAN, J.A.W., PICKUP, R.W., 1993, *Flagella and pili as antigenically variable structures on the bacterial surfaces.* J. of Appl. Bacteriology Symposium Suppl.: "Microbial cell envelopes: interactions and biofilms" (Quesnel, L.B., Gilbert, P., Handley, Pauline S., eds.), Blackwell Sciet. Public., Oxford., **74:** 33S – 42S.
273. SAVAGE, D.C., 1980, *Adherence of normal flora to mucosal surfaces.* In: "Bacterial adherence: Receptors and recognition"(Beachey, E.H., ed.) . Series B, vol. 6, Chapman & Hall, London, p. 31 – 59.
274. SAVAGE, D.C., 1984, *Activities of microorganisms attached to living surfaces.* In: "Microbial adhesion and aggregation" (Marshall, K.C., ed.), Dahlem Konferenzen, Springer-Verlag, Berlin, p. 233 – 249.
275. SCALETSKY, ISABEL C.A., SILVA, LOURDES M., TRABULSI, L.R., 1984, *Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic Escherichia coli to HeLa cells.* Inf. and Immunity, **45:** 534 – 536.
276. SCHURTZ, TRICIA A., HORNICK, D.B., KORHONEN, T.K., CLEGG, S., 1994, *The type 3 fimbrial adhesin gene (mrkD) of Klebsiella species is not conserved among all fimbriate strains.* Inf. and Immunity, **62:** 4186 – 4191.
277. SEBGHATI, T.A.S., KORHONEN, T.K., HORNICK, D.B., CLEGG, S., 1998, *Characterization of the type 3 fimbrial adhesins of Klebsiella strains.* Inf. and Immunity, **66 :** 2887 – 2894.
278. SENET, J.- M., 1995, *Phénomènes d'adhérence et molecules impliquées dans l'intéraction entre la levure Candida et son hôte.* Bull. Soc. Fr. Microbiol., **10:** 279 - 283.
279. SERKIN, CARLA D., SEIFERT, S.H., 1998, *Frequency of pilin antigenic variation in Neisseria gonorrhoeae.* J. of Bacteriology, **180:** 1955 – 1958.
280. SHANSON, D.C., 1999, *Microbiology Clinical Practice.* Third Ed., Butterworth Heinemann, Oxford.
281. SHARON, N., LIS, H., 1993, *Carbohydrates in cell recognition.* Scient. Amer., Jan., 74 – 81.
282. SINGLETON, P., SAINSBURY, D., 1997, *Dictionary of microbiology and molecular biology.* Sec. Ed., John Wiley & Sons, Chichester, U.K.
283. SLEYTR, U.B., MESSNER, P., PUM, D., SARA, M., 1993, *Crystalline bacterial cell surface layers: general principles and application potential.* J. of Appl. Bacteriology Symposium Suppl.: " Microbial cell envelopes: interactions and biofilms" (Quesnel, L.B., Gilbert, P., Handley, Pauline S., eds.), Blackwell Sciet. Public., Oxford., **74:** 21S – 32S.
284. SMITH, H., 1995, *The state and future of studies on bacterial pathogenicity.* In: "Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens. Cap. VI. Past, present and future studies. " (Roth, J.A., Bolin, Carole A., Brogden, Kim A., Minion, F.C., Wannemuehler, M.J. eds.). Sec. Ed., ASM Press, Washington, D.C., P. 335 – 357.
285. SOARES, E.V., TEIXEIRA, J.A., MOTA, M., 1992, *Interaction between flocculent and nonflocculent cells of Saccharomyces cerevisiae.* Can. J. Microbiol., **38:** 969 - 974.
286. SOUSSY, C. J. (coord.), 1997, *Communiqué du Comité de l' Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie*, Bull. Soc. Fr. de Microbiologie, **12 (4):** 369-371.
287. SOUSSY, C. J. (coord.), 1999, *Communiqué du Comité de l' Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie*, Bull. Soc. Fr. de Microbiologie, p. 17-21.
288. SPOTL, L., MOST, J., DIERICH, M.V., 1994, *Ca ions stabilize the binding of complement factor iC3b to pseudohyphal form of Candida albicans.* Inf. and Immunity, **62:** 1225 – 1227.
289. STADDON, W., TODD, T., IRVIN, R.T., 1990, *Equilibrum analysis of binding of Candida albicans to human*

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

buccal epithelial cells. Can. J. of Microbiol., **36:** 336 - 340.
290. STORDEUR, P., CHINA, B., CHARLIER, G., ROELS, S., MAINIL, J., 2000, *Clinical signs, reproduction of attaching/effacing lesions, and enterocyte invasion after oral inoculation of an O 118 enterohaemorrhagic Escherichia coli in neonatal calves.* Microbes and Infection, **2:** 17 - 24.
291. STOUT, R.D., LI, Y., MILLER, A.R., LAMBE, JR., DWIGHT, W., 1994, *Staphylococcal glycocalyx activates macrophage prostaglandin E_2 and interleukin 1 production and modulates tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production.* Inf. and Immunity, **62:** 4160 - 4166.
292. SUMMANEN, PAULA, BARON, ELLEN JO, CITRON, DIANE, STRONG, CATHERINE A.,WEXLER, H. M., FINEGOLD, S.M., 1993, *Wadsworth anaerobic bacteriology manual.* Star Publishing Comp., Belmont, California, 33 – 37.
293. SVENSSON,M., LINDSTEDT,R., RADIN,N.S., SVANBORG,C., 1994, *Epithelial glucosphingolipid expression as a determinant of bacterial adherence and cytokine production.* Inf. and Immunity, **62:** 4404-4410.
294. SWARTLEY, J.S., LIU, LI-JUN, MILLER, Y.K., MARTIN, L.E., EDUPUGANTI, SRILATHA, STEPHENS, D.S., 1998, *Characterization of the gene cassette required for biosinthesis of the (α-1→6)- linked N-acetyl-D-Mannosamine-1-phosphate capsule of serogroup A Neisseria meningitidis.* J.of Bacteriology,**180:** 1533 – 1539.
295. TANCREDE, C., AZIZI, P., RAIBAUD, P., DUCLUZEAU, R., 1977, *Conséquences de la destruction des barrières écologiques de la flore du tube digestif par les antibiotiques. Perturbations des relations entre l'hôte et les bactéries potentiallement pathogènes.* Médicine et Maladies Infféctieuses, **7 :** 145 – 149.
296. TANCREDE,C., 1989, *Flore intestinale et pathologie infectieuse umaine.* Rev. Sc. Tech. Off. int. Epiz., **8:** 405 - 415.
297. TANCREDE, C., 1992, *Role of human microflora in health and disease.* Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., **11:** 1012 - 1016.
298. TARKKANEN, A.M., VIRKOLA, R., CLEGG., S., KORHONEN, T.K., 1997, *Binding of the type 3 fimbriae of Klebsiella pneumoniae to human endothelial and urinary bladder cells.* Inf. and Immunity, **65:** 1546 – 1549.
299. TEMPORADO COOKSON, SUSAN, NATARO, J.P., 1996, *Characterization of Hep-2 cell projection formation induced by diffusely adherent Escherichia coli.* Microbial Pathogenesis, **21:** 421 – 434.
300. TEWARI, R., IKEDA, T., MALAVIYA, R., Mac GREGOR, JENNIFER I., LITTLE, R.J., HULTGREN, S.J., ABRAHAM, S.N., 1994, *The PapG adhesin of P fimbriae protects Escherichia coli from neutrophil bactericidal activity.* Inf. and Immunity, **62:** 5296 – 5304.
301. THOMSON, R.C. A., 2001, *The future impact of societal and cuultural factors on parasitic disease – some emerging issues.* Int. J. Parasitol., 949 – 959.
302. THORNS, C.J., BELL, M.M., SOJKA, MARCJANNA G., NICHOLAS, R.A., 1996, *Development and application of enzyme-linked immunosorbent assay for specific detection of Salmonella enteritidis infections in chickens based on antibodies to SEF 14 fimbrial antigen.* J. of Clin. Microbiol., **34:** 792 – 797.
303. THORNSBERRY, C., TOMFOHRDE, K., SAHM, D., 1997, *Antibiotic Surveillance Studies: Clinical Utility.* Report at the Symposium Immediately Preceding the 35th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America, San Francisco, U.S.A.
304. TOMA, N., 1989. *Citologia drojdiilor.* In : Biologia si tehnologia drojdiilor - Vol. I (Anghel, I., coord.). Editura Tehnica, Bucuresti, p. 13 – 21.
305. TORTORA, G.J., FUNKE, B.R., CASE, CHRISTINE, L., 1986, *Microbiology: An introduction.* Sec.ed., The Benjamin/Cummings Publish. Comp., Inc., Menlo Park, California, p. 82 - 83.199.
306. TORTORA, G.J., FUNKE, B.R., CASE, CHRISTINE, L., 1998, *Microbiology: An introduction.* Sixth ed., The Benjamin/Cummings Publish. Comp., Inc., Menlo Park, California, p. 423 – 431.
307. TRUCKSIS, M., 2000, *Fishing for mycobacterial virulence genes: a promising animal model.* ASM News, **66:** 668 - 674.
308. TUNNEY, M.M., GORMAN, S.P., PATRICK, S., 1996, *Infections associated with medical devices.* Reviews in Med. Microbiol., 7 **(4):** 195-205.
309. TUNNEY, M.M., JONES, D.S., GORMAN, S.P., 1997, *Methacrylate polymers and copolymers as urinary tract biomaterials: resistance to encrustation and microbial adhesion.* Intern. J. of Pharmaceutics, **151:** 121-126.
310. VASSU, TATIANA, STOICA, ILEANA, CSUTAK, ORTANSA, MUSAT, F., 2001. *Genetica microorganismelor si inginerie genetica microbiana - Note de curs si tehnici de laborator.* Ed. Petrion, Bucuresti
311. VIRJI, M., 1996, *Microbial utilization of human signalling molecules.* **142:** 3319 – 3336.
312. VIZITIU, OLIVIA, 1995, *Diagnosticul de laborator al legionelozelor.* Bacteriologia, Virusologia, Parazitologia, Epidemiologia, **40:** 59 – 67.
313. WAI, S.N., MIZUNOE, Y., TAKADE, A., KAWABATA, S.-I., YOSHIDA, S.-I., 1998, *Vibrio cholerae O1*

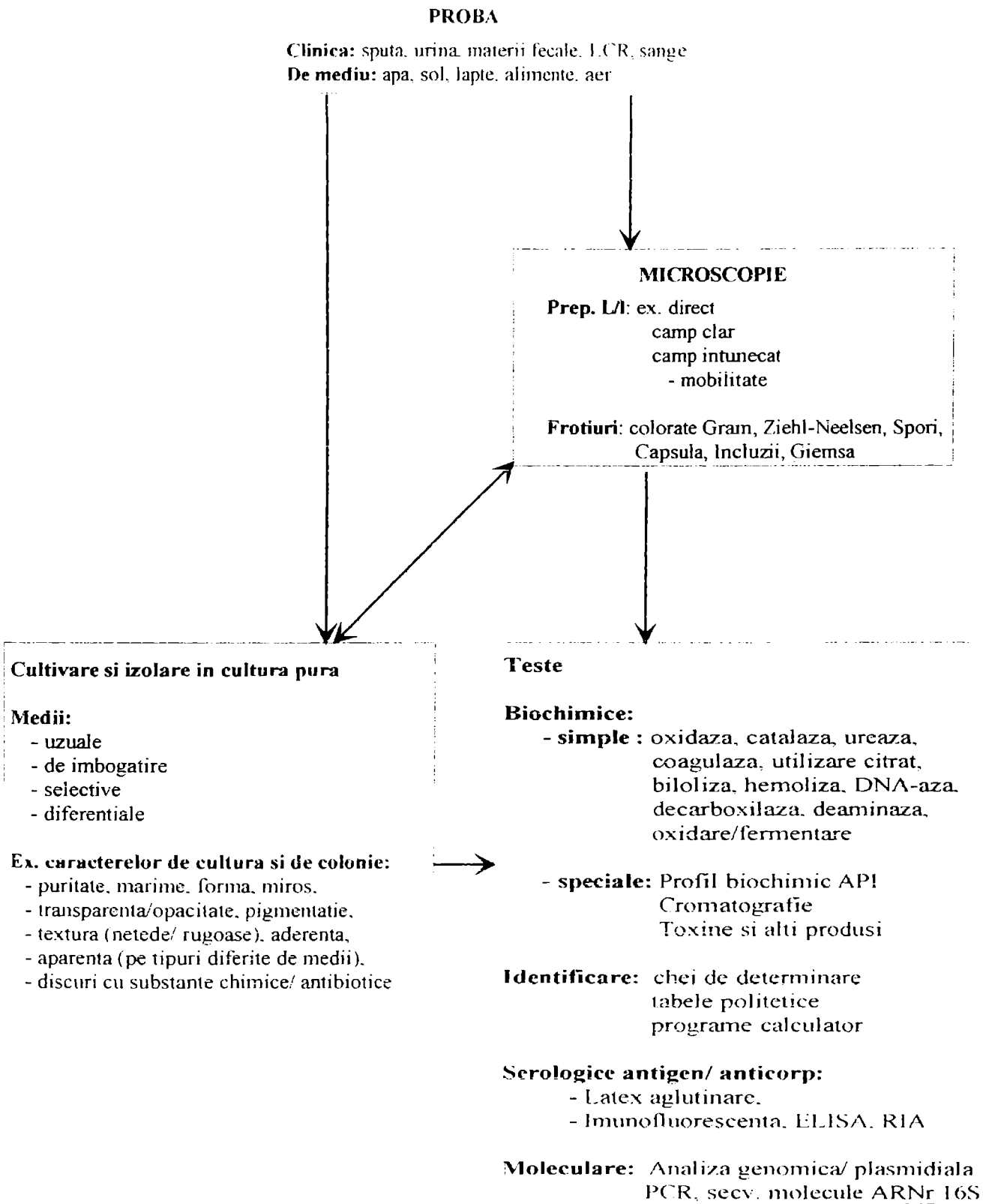
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

strain TSI-4 produces the exopolysaccharide materials that determine colony morphology, stress resistance, and biofilm formation. Appl. Environmental Microbiol., **64:** 3648 – 3655.
314. WARREN, NANCY G., SHADOMY, H.J., 1991. *Yeasts of Medical Importance.* In: "Manual of Clinical Microbiology", 5th ed. (Balows, ed.), Amer. Soc. for Microbiology, Washington D.C., p. 617 -630.
315. WATT, P.J., WARD, M.E.,1980. *Adherence of Neisseria gonorrhoeae and other Neisseria species to mammalian cels.* In: *Bacterial adherence: Receptors and recognition* (Beachey, E.H., ed.). Series B, vol. 6, Chapman and Hall, London, p. 251-288.
316. WEYANT, R.S., MOSS, C.W., WEAVER, R.E., HOLLIS, D.G., JORDAN, J.G., COOK, E.C., DANESHVAR, M.I., 1996. *Identification of Unusual Pathogenic Gram-Negative Aerobic and Facultatively Anaerobic Bacteria.* Second Ed., Williams & Wilkins, Baltimore, p. 25 - 32.
317. WICHEN,A.J., 1980, *Structure and cell membrane binding properties of bacterial lipoteichoic acids and their possible role in adhesion of steptococci to eukariotic cells.* In: "Bacterial adherence: Receptors and recognition" (Beachey, E.H., ed.). Series B, vol. 6, Chapman and Hall, London, p. 137 - 158.
318. WIELER, L.H., VIELER, E., ERPENSTEIN, C., SCHLAPP, T., STEINRUCK, H., BAUERFEIND, R., BYOMI, A., BALJER, G., 1996. *Shiga toxin-producing Escherichia coli strains from bovines: association of adhesion with carriage of eae and other genes.* J. of Clin. Microbiol., **34:** 2980 – 2984.
319. WILSON, K.H., 1995, *Ecological concepts in the control of pathogens.* In: "Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens. Cap. V. Strategies to overcome bacterial virulence mechanisms" (Roth, J.A., Bolin, Carole A., Brogden, Kim A., Minion, F.C., Wannemuehler, M.J. eds.). Sec. Ed., ASM Press, Washington, D.C., . 245 – 256.
320. XU, KAREN D., STEWARD, P.S., XIA, FUHU, HUANG, C.-T., McFETERS, G.A., 1998, *Spatial physiological heterogeneity in Pseudomonas aeruginosa biofilm is determined by oxygen availability.* Appl. Environmental Microbiol., **64:** 4035 – 4039.
321. YASUDA, H., AJIKI, Y., AOYAMA, J., YOKOTA, T., 1994, *Interaction between human polymorphonuclear leucocytes and bacteria released from in vitro bacterial biofilms model.* J. Med. Microbiol., **41:** 359 - 367.
322. ZARNEA, G., 1983, *Tratat de microbiologie generala.* vol. I, Edit. Academiei, Bucuresti.
323. ZARNEA, G., 1984, *Tratat de microbiologie generala.* vol. II, Edit. Academiei, Bucuresti.
324. ZARNEA, G., 1986, *Tratat de microbiologie generala.* vol. III, Edit. Academiei, Bucuresti.
325. ZARNEA, G., 1990, *Tratat de microbiologie generala.* vol. IV, Edit. Academiei, Bucuresti.
326. ZARNEA, G., 1994, *Tratat de microbiologie generala.* vol. V, Edit. Academiei, Bucuresti.
327. ZIERLER, M.K., GALAN, J.E., 1995, *Paradigms in bacterial entry into host cells.* In: "Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens". Cap. I. „Bacterial adherence, colonization and invasion on mucosal surfaces" (Roth, J.A., Bolin, Carole A., Brogden, Kim A., Minion, F.C., Wannemuehler, M.J. eds.). Sec. Ed., ASM Press, Washington, D.C., p. 21 – 31.

*

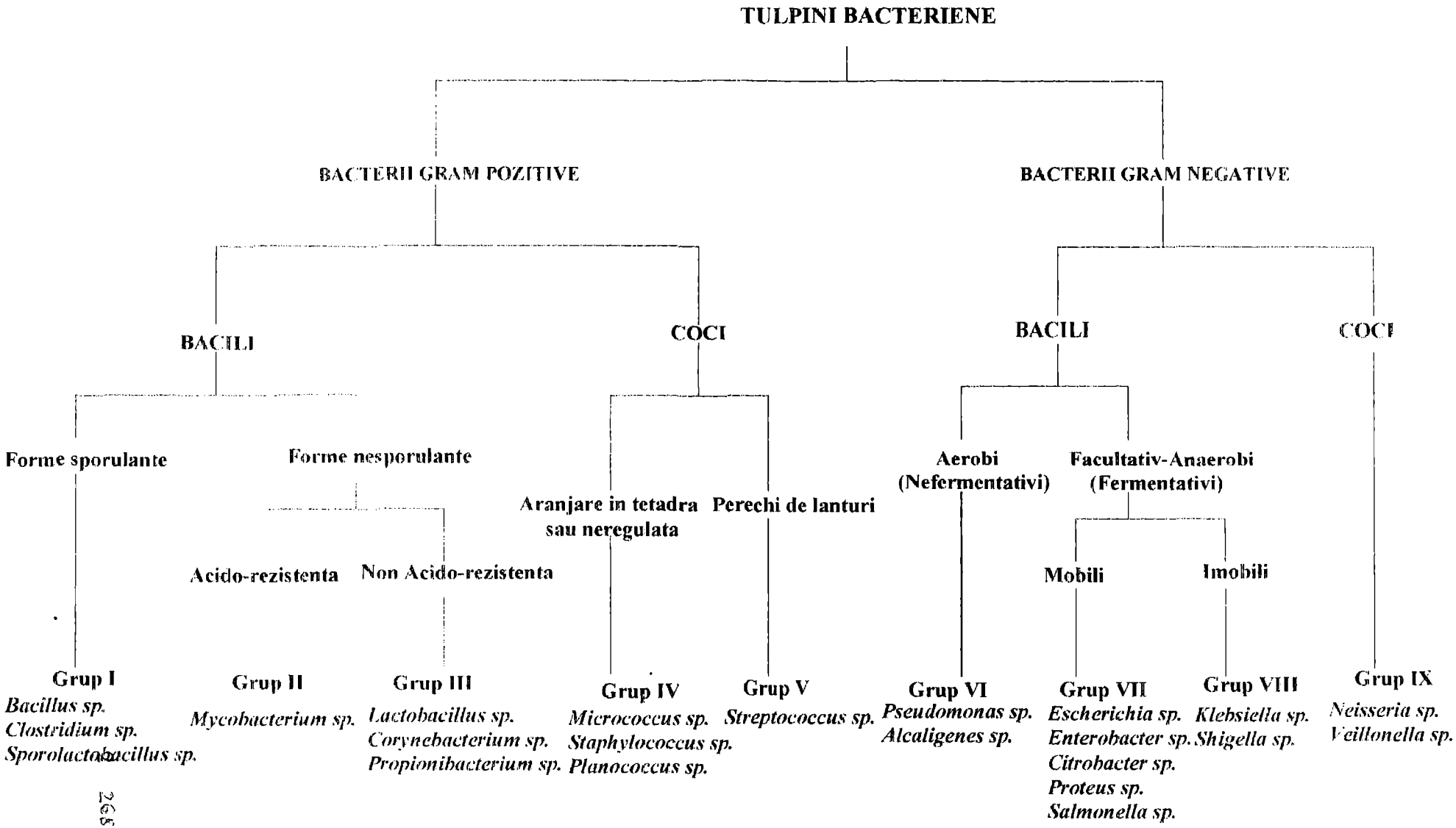
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

ETAPELE IDENTIFICARII AGENTILOR PATOGENI
DIAGNOSTICUL MICROBIOLOGIC



https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

CHEIE DE DETERMINARE



https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Mediu CHRISTENSEN – mediu pentru evidentierea producerii ureazei: mediul contine (g/l):

Peptona din carne.....1g
Glucoza..... 1g
NaCl 5g
Fosfat acid de amoniu.....2g
Rosu neutru.....0,012g
Agar-agar.....12g
pH final = 6,8 +/- 0,2
Se adauga uree, solutie 20 g/l;
Sterilizare prin autoclavare la 121°C, 15 min

Mediu - CISTEINA TRIPTICAZA AGAR (CTA) cu lichid de ascita si/sau carbohidrati – este recomandat pentru determinarea reactiilor de fermentatie la organismele pretentioase, cum ar fi : Neisseria , pneumococi, streptococi si anaerobi nesporogeni si are are compozitia (g/l):

Mediu de baza:

Cazeina peptona .....20.0 g
L- Cisteina .....0.5 g
NaCl .....5.0 g
Sulfit de sodiu .....0.5 g
Rosu fenol .....17.0 mg
Agar-agar.....2.5 g
pH final =7.3+/- 0.2
Sterilizare prin autoclavare la 121°C, 20 min

Optional se adauga in mod steril per litru de mediu CTA, solutii concentrate de glucide, care sa realizeze concentratii finale de 10g glucid /l mediu sau lichid de ascita.

Mediu pentru DERMATOFITI - recomandat pentru izolarea selectiva a microfungilor dermatofiti, are compozita (g/l):

Peptona de soia .....10.0 g
Dextroza.....10.0 g
Rosu fenol .....0.2 g
Agar -agar.....20.0 g
pH final= 5.5+/- 0.2
Sterilizare prin autoclavare la 115°C, 30 min. apoi adaugare de antibiotice -solutii sterile : Cicloheximida .....0.5 g
Cloramfenicol.....0.1 g
Gentamicina.....0.1 g

Mediu DRIGALSKI – mediu de diagnostic diferential (neselectiv), care permite diferentierea lactozo-fermentativilor (care formeaza colonii de culoare galbena), de lactozo-nefermentativi (care formeaza colonii de culoare verde-albastra) . Are urmatoarea formula (g/l):

Peptona.....15g
Extract de carne.....3g
Extract de drojdii.....3g
Tiosulfat de sodiu.....1g
Lactoza.....15g
Albastru de bromtimol.....0,08g
Agar-agar.....11g
pH final = 7,4 +/- 0,2
Sterilizare prin autoclavare la 0,5 atm, 30 min.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Mediu EMB AGAR (LEVINE) – este recomandat pentru izolarea si diferentierea speciilor de bacili Gram-negativi enterici (pt. analiza bacteriologica apei), are compozitia (g/l):

Peptona .....10.0 g
Lactoza.....10.0 g
Fosfat dipotasic .....2.0 g
Eozina Y .....0.4 g
Albastru de metilen.....0.065 g
Agar -agar.....15.0 g
pH final = 7.1+/- 0.2 .
Sterilizare prin autoclavare la 0.5 atm, 30 min.

Mediu solid cu ESCULINA– este recomandat pentru detectarea capacitatii de a hidroliza esculina si are compozitia (g/l):

Extract de cord bovin .....2.0 g
Cazeina peptona .....13.0 g
NaCl.....5.0 g
Extract de drojdii .....5.0 g
Vitamina K .....10.0 mg
Hemina.....5.0 g
Esculina.....1.0 g
Citrat feric amoniacal.....0.5 g
Agar .....15.0 g
pH final = 7.0+/- 0.2

Mediu cu GELATINA –este recomandat pentru determinarea capacitatii microorganismelor de a lichefia gelatina (proteoliza); are compozitia:

Peptona .....5.0 g
Extract carne.....3.0 g
Gelatina .....12.0 g
pH final = 6.8+/- 0.2
Sterilizare prin autoclavare la 121°C, 20 min

Mediu GELOZA NUTRITIVA, folosit pentru cultivarea unui numar mare de bacterii , are urmatoarea compozitie (g/l) :

Peptona.....10g
Extract de carne.....10g
NaCl.....5g
Agar-agar.....20g
pH final = 7,2 – 7,4
Sterilizare prin autoclavare la 121°C, 20 min

Mediu solid pentru *HAEMOPHILUS* *sp.*– este recomandat pentru izolarea si cultivarea hemofililor, care necesita anumiti factori de crestere si produc hemoliza pe mediu cu sânge de cal si are formula (g/l):

Mediu de baza:

Extract de cord bovin .....2.0 g
Cazeina peptona .....13.0 g
Extract de drojdii .....5.0 g
NaCl .....5.0 g
Agar .....15.0 g
pH final = 7.4+/- 0.2
Sterilizare prin autoclavare la 121°C, 20 min
Se adauga in mod steril, per litru de mediu:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Hemina (cadranele I si III) .....20.0 mg
Sânge de cal (cadranul IV)..... 50.0 ml
NAD (cadranul II, III si IV).....0.1 g

Mediu HUGH – LIEFSON- este recomandat pentru determinarea metabolismului oxidativ si fermentativ al hidratilor de carbon de catre bacilii gram-negativi ; are urmatoarea compozitie (g/l):

Mediu de baza :

Cazeina peptona .....2.0 g
NaCl .....5.0 g
Fosfat dipotasic .....0.3 g
Albastru de brom timol.....35.0 mg
Agar –agar .....2.5 g
pH final = 6,8 +/- 0,2
Sterilizare prin autoclavare la 121°C, 20 min

Se adauga câte unul din glucidele urmatoare, in concentratie finala de 10 g/ litru de mediu, sub forma unor solutii concentrate, sterilizate prin filtrare: arabinoza, dextroza, dulcitol , fructoza, galactoza, glicerol, lactoza, maltoza, manitol, manoza, rafinoza, ramnoza, salicina, zaharoza, xiloza. In tuburile cu mediu se pot adauga si tuburi Durham, pentru evidentierea producerii de gaze.

Mediu LOWENSTEIN-JENSEN (mediu ou - cartof glicerinat) pentru cultivarea micobacteriilor, cu urmatoarea formula (g/l):

Faina de cartof.....30g
Glicerol.....12 ml
Asparagina..... 3,6g
Fosfat monopotasic.....2.4g
Sulfat de magneziu.....0,24g
Citrat de magneziu.....0,6g
Verde malahit.....0,4g
Apa distilata.....600ml
Sterilizare prin autoclaare la 110°C, 15 min, dupa care se adauga in mod steril:
Ou integral.....1000ml

Mediu cu MANITOL (CHAPMAN) – mediu cu manitol, pentru stafilococi, cu formula (g/l):

Peptona.....10g
Manitol.....10g
NaCl.....75g
Rosu fenol..... 0,025
Agar-agar.....15
pH final = 7,5 +/- 0,2
Sterilizare prin autoclavare la 121°C, 15 min

Mediu Mc CONKEY – mediu selectiv pentru enterobacterii, care evidentiaza si speciile lactozo-fermentative, cu urmatoarea formula (g/l):

Peptona.....20g
Lactoza.....10g
Saruri biliare.....5g
NaCl.....5g
Rosu neutru.....30mg
Cristal violet..... 1mg
Agar-agar.....12g
pH final = 7,4 +/- 0,2

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Sterilizare prin autoclavare la 0,5 atm, 30 min

Mediu MILF (mobilitate, indol, lizin decarboxilaza, fenilalanil dezaminaza) – mediu multitest, cu formula (g/l): Extract de drojdii.....3g
L-lizina.....5g
DL-fenilalanina.....4g
DL-triptofan.....0,1g
Glucoza..... 0,75g
NaCl.. .....5 g
Purpura de bromcrezol 1/500.....8ml
Agar-agar.....3g
pH final = 6,8 +/- 0,2
Sterilizare prin autoclavare la 0,5 atm, 30 min

Mediu MRS lichid (cu tuburi Durham) - mediu utilizat pentru cultivarea speciilor de *Lactobacillus* si pentru diferentierea cocilor gram-pozitvi, cu urmatoarea compozitie (g/l):
Gelatina Peptona .....10.0 g
Extraxt bovin .....8.0 g
Extract de drojdii .....4.0 g
Dextroza .....20.0 g
Fosfat dipotasic .....2.0 g
Polisorbat 80 .....1.0 g
Acetat sodic .....5.0 g
Citrat de amoniu .....2.0 g
Sulfat de magneziu .....0.2 g
Sulfat de mangan .....0.05 g
pH final = 6,2 +/- 0,2
Sterilizare la 115°C, 15 min

Mediu MRVP lichid – recomandat a fi utilizat in testele Rosu-Metil si Voges Proskauer si in identificarea bacililor enterici gram-negativi, cu urmatoarea compozitie:
Cazeina peptona .....3.5 g
Peptona .....3.5 g
Dextroza .....5.0 g
Fosfat dipotasic .....5.0 g
pH final= 6,9+/- 0,2
Sterilizare prin autoclavare la 115°C, 15 min

Mediu MUELLER HINTON lichid - este recomandat pentru determinarea sensibilitatii bacteriilor la antibiotice si agenti antimicrobieni in general si pentru determinarea concentratiei minime inhibitorii (C.M.I.) prin metoda dilutiilor seriale a substantei antimicrobiene. Acest mediu este recomandat si pentru cultivarea unei varietati largi de microorganisme. Are urmatoarea compozitie (g/l):
Extract de carne.....2.0 g
Amidon solubil.....1.5 g
Hidrolizat de cazeina.....17.5 g
pH 7.3+/- 0.1
Sterilizare prin autoclavare la 121°C, 20 min

Mediu MUELLER HINTON solid - mediu standard recomandat pentru testarea rezistentei la antibiotice a bacteriilor aerobe si facultativ anaerobe (prin metoda difuzimetrica Kirby-Bauer), cu urmatoarea compozitie (g/l):
Extract de carne .....2.0 g

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Amidon .....1.5 g
Hidrolizat de cazeina.... ....17.5 g
Agar-agar.....17.0 g
pH final = 7,2 - 7,4
Sterilizare prin autoclavare la 121°C, 20 min

Mediu O.M.S. – mediu semisolid, recomandat de Organizatia Mondiala a Sanatatii, pentru conservarea in laborator a enterobacteriilor, cu urmatoarea formula (g/l):

Bactopeptona.....10 g
NaCl.....5 g
Agar-agar.....4 g
pH final = 7,2
Sterilizare la 121°C, 20 min

Mediu P.R.A.S. – este recomandat pentru transportul speciilor de bacterii anaerobe sensibile la oxigen si are urmatoarea compozitie (g/l) :

Peptona .....10.0 g
Extract de drojdii .....10.0 g
Hidroclorid de L- Cisteina .....0.5 g
VPI.....40.0 g
Resazurina..... .4.0 ml
pH final = 7.0+/- 0.2
Sterilizare la 121°C, 20 min

Mediu ROSU FENOL - este recomandat pentru determinarea proceselor fermentative ale microorganismelor; are compozitia (g/l):

Mediu de baza:

Cazeina peptona .....10.0 g
NaCl.....5.0 g
Rosu fenol .....18.0 mg
pH final = 7,4+/- 0,2
Sterilizare prin autoclavare la 121°C, 20 min

Urmatorii carbohidrati sunt utilizati per litru de mediu: adonitol , arabinoza, celobioza, dextroza, dulcitol, eritritol, fructoza, galactoza, glicerol, inozitol, lactoza, maltoza , manitol , manoza, melibioza, rafinoza, ramnoza, salicina, sorbitol, zaharoza, trehaloza, xiloza.

Mediu SABOURAUD-dextroza, pentru izolarea si cultivarea microfungilor, cu urmatoarea formula (g/l):

Cazeina- peptona.....5g
Peptona din carne.....5 g
Dextroza.....40 g
Agar-agar.....20 g
pH final = 5,6 +/- 0,2
Sterilizare prin autoclavare la 121°C, 15 min

Mediu SELLERS solid - este recomandat pentru diferentierea si identificarea bacililor Gram-negativi, nefermentativi , are compozitia (g/l):

Peptona .....20.0 g
NaCl .....2.0 g
D- Manitol .....2.0 g
Sulfat de Magneziu ..... 1.5 g
Extract de drojdii .....1.0 g
L-Arginina .....1.0 g

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Fosfat dipotasic .....1.0 g
Nitrat de sodiu .....1.0 g
Nitrit de sodiu ....0.35 g
Albastru de brom timol. .....0.04 g
Rosu fenol .....8.0 g
Agar -agar.....15.0 g
pH 6.7+/- 0.2
Sterilizare prin autoclavare la 115°C, 30 min

Mediu SIMMONS – mediu pentru evidentierea utilizarii citratului ca unica sursa de carbon; mediul are formula (g/l):

Fosfat acid de amoniu.....1g
Fosfat monoacid de potasiu.....1g
NaCl.....5g
Citrat de sodiu.....2g
Sulfat de magneziu.....0,2g
Albastru de brom timol.....0,08g
Agar-agar.....15g
pH final = 6,8 +/- 0,2
Sterilizare prin autoclavare la 121°C, 15 min

Mediu S.S. – recomandat inalt selectiv si diferential pentru izolarea speciilor de Salmonalla si Shigella din produse patologice si alimente contaminate, cu urmatoarea formula (g/l):

Extract de carne.....5.0 g
Peptona.....5.0 g
Lactoza.....10.0 g
Saruri biliare.....5.5 g
Citrat de sodiu.....10.0 g
Tiosulfat de sodiu..... 8.5 g
Citrat feric.....1.0 g
Verde briliant.....0.00033 g
Rosu neutru.....0.025 g
Agar-agar.....12.0 g
pH final = 7,3 +/- 0,2
Sterilizare prin afierbere (nu se autoclaveaza)

Mediu Nr. 110 pentru *Staphylococcus sp.* , cu urmatoarea formula(g/l):

Extract de drojdii.....2.5g
Triptona.....10.0g
Lactoza.....2.0g
Manitol.....10.0g
NaCl.....5.0g
Fosfat acid dipotasic.....5.0 g
Gelatina.....30.0g
Agar-agar.....15.0g
pH final = 7,1 +/- 0,2
Sterilizare prin autoclavare la 121°C, 15 min

Mediu de transport STUART - recomandat pentru transportul si conservarea speciilor de microorganisme, are urmatoarea compozitie (g/l):

Glicerofosfat de sodiu .....10.0 g
Tioglicolat de sodiu .....1.0 g
Clorura de calciu .....0.1 g

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Albastru de metilen .....2.0 mg
Agar-agar ..... 3.0 g
pH final = 7,4+/- 0,2
Sterilizare prin autoclavare la 121°C, 20 min

Mediu TCBS - ete recomandat pentru izolarea selectiva a speciei *Vibrio cholerae* si a altor specii enteropatogene de *Vibrio* , are compozitia:

Cazeina peptona .....5.0 g
Peptona de carne .....5.0 g
Extract de drojdii .....5.0 g
Citrat de sodiu .....10.0 g
Tiosulfat de sodiu .....10.0 g
Oxgal.....5.0 g
Zaharoza .....20.0 g
NaCl.....3.0 g
Clorit de sodiu .....10.0 g
Citrat feric .....1.0 g
Albastru de brom timol.....0.04g
Timol 0.04g
Agar .....15.0 g
pH final 8.6 +/- 0.2
Sterilizare prin autoclavarela 115°C, 15 min

Mediu THAYER - MARTIN solid- recomandat pentru izolarea speciilor de *Neisseria gonorrhoeae* si *Neisseria meningitidis* , are compozitia:

Cazeina Peptona .....7.5 g
Peptona..... .....7.5 g
Amidon ....1.0 g
Fosfat dipotasic .....4.0 g
Fosfat monopotasic .....1.0 g
NaCl .....5.0 g
Solutie de hemoglobina .....350.0 ml
GCHI (supliment)i.....10.0 ml
Dextroza .....1.5 g
Agar .....10.0 g
Apa distilata .....650.0 ml
pH final = 7,2 +/- 0,2
Sterilizare prin autoclavare la 115°C, 15 min, apoi adaugare de antibiotice -solutii sterile : Lactat trimetoprim .....6.25 .g
Colistin .....7.5 mg
Nistatin .....12500 IU
Vancomicina.....4.0 mg

Mediu TINSDALE solid, recomandat pentru izolarea si cultivarea corinebacteriilor, are urmatoarea formula (g/l) :

Proteoza peptona 20g
Extract de drojdii.....5g
NaCl.....5g
L-cisteina..... .0,24g
Agar-agar.....15g
pH final = 8 (dupa adaugarea suplimentului)
Sterilizare prin fierbere.
Supliment :ser bovin.....20ml

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Telurit de potasiu.....0.06 g
Tiosulfat de sodiu.....0,085g
Se pastreaza la 4°C

Mediu cu TIOGLICOLAT - recomandat pentru cultivarea bacteriilor anaerobe si microaerofile, cu urmatoarea compozitie (g/l):

Triptona ....15.0 g
Dextroza .....5.5 g
Extract de drojdii.....5.0 g
NaCl .....2.5 g
Tioglicolat de sodiu .....0.5 g
L-Cistina .....0.5 g
Sulfit de sodiu .....0.1 g
Rezazurina.....0,001g
Agar-agar.....0.5 g
pH final = 7,1+/- 0,2 .
Sterilizare prin autoclavare la 121°, 15 min

Mediu TSI (*triple sugars iron agar*) - mediu multitest, cu urmatoarea formula:

Peptona.....5g
Extract de carne.....3g
Extract de drojdii.....3g
Glucoza..... 1g
Lactoza.....10g
Zaharoza 10g
NaCl .....5 g
Tiosulfat de sodiu.....0,5g
Agar-agar.....12g
pH final = 6,8 +/- 0,2
Sterilizare prin autoclavare la 0,5 atm, 30 min

Mediu Y.P.G. – recomandat pentru cresterea si pastrarea in colectie a levurilor, cu urmatoarea compozitie (g/l):

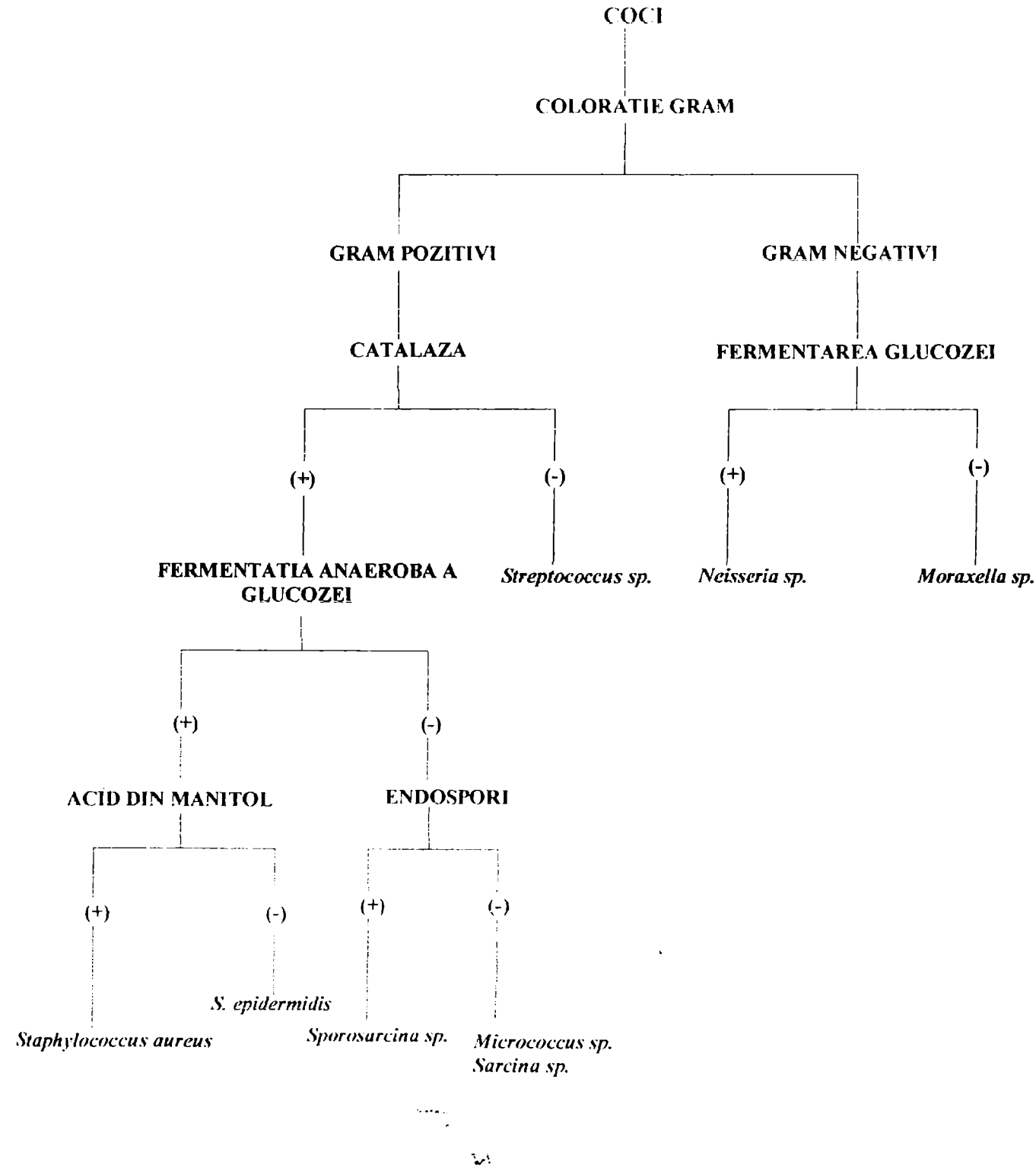
Extract de drojdii.....10g
Peptona.....10g
Glucoza.....20g
pH final = 6 +/- 0.2
Sterilizare prin autoclavare la 115°C, 30 min.

*

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ BUCUREȘTI
VERIFICAT 2007

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

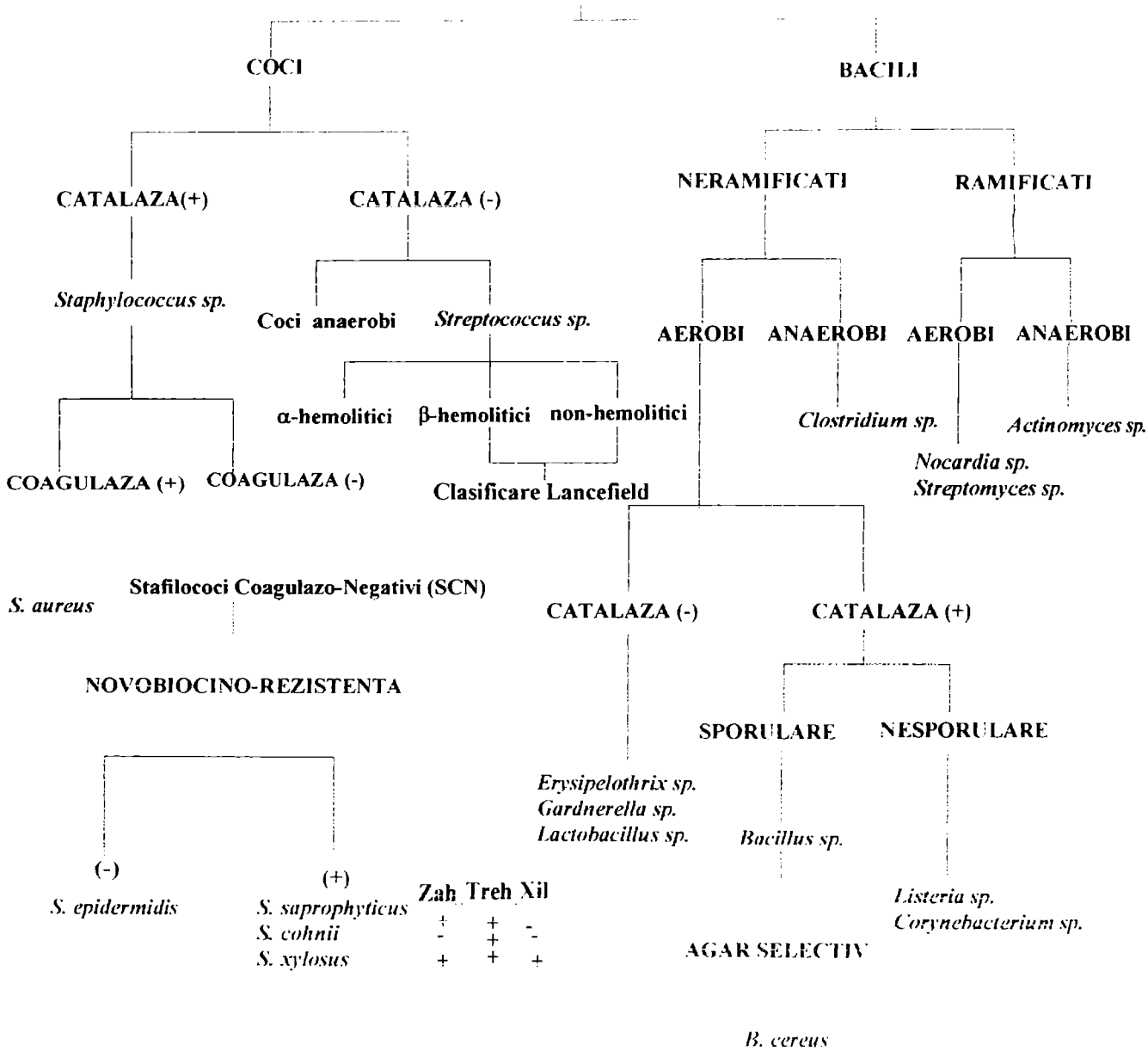
CHEIE DE DETERMINARE



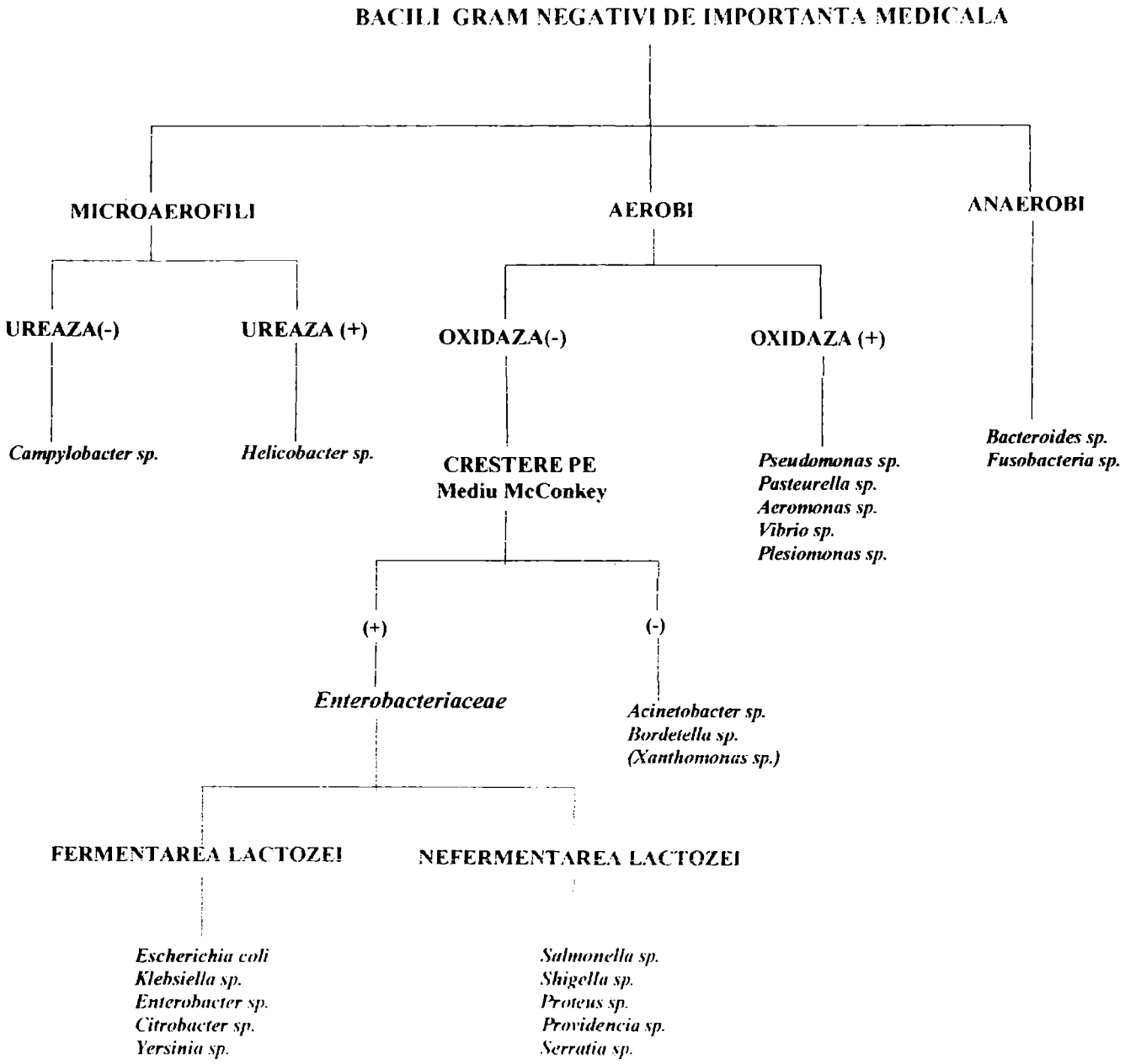
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

CHEIE DE DETERMINARE

BACTERII GRAM POZITIVE DE IMPORTANTA MEDICALA

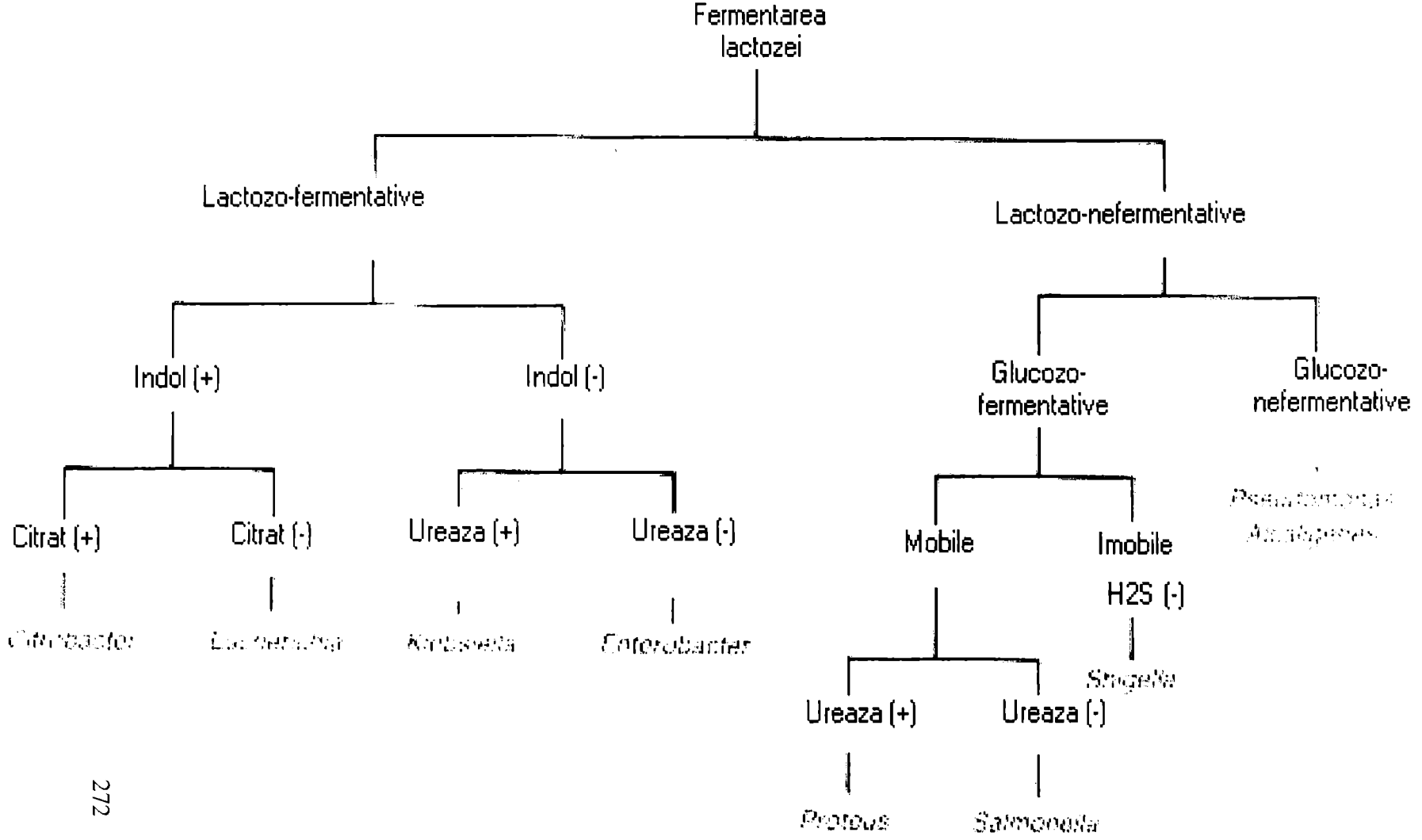


https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Cheie dichotomica de identificare a enterobacteriilor



https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Mediu BULION SELENIT (+/-Cisteina) - recomandat ca mediu de imbogatire. pentru izolarea speciilor de *Salmonella*; are urmatoarea compozitie (g/l):

Fosfat de Sodiu ....10.0 g
Lactoza .....4.0 g
Cazeina Peptona .....5.0 g
Selenit de Sodiu .....4.0 g
pH final = 7.0 +/- 0,2
Sterilizare prin autoclavare la 115°C, 30 min

Optional se poate adauga:

L-Cisteina .....0.01 g

Mediu BULION de SOIA - recomandat pentru izolarea si cultivarea a numeroase microorganisme, are compozitia (g/l) :

Cazeina peptona .....17.0 g
Peptona de soia .....3.0 g
NaCl .....5.0 g
Fosfat dipotasic .....2.5 g
Dextroza .....2.5 g
pH final = 7,3+/- 0,2
Sterilizare prin autoclavare la 115°C, 15 min

Mediu BULION de SOIA TRIPTICAZA / 15% GLICEROL - este recomandat pentru pastrarea in colectie a bacteriilor; are compozitia:

Cazeina peptona .....17.0 g
NaCl.....5.0 g
Peptona de soia .....3.0 g
Fosfat dipotasic .....2.5 g
Dextroza .....2.5 g
Glicerol .....150.0 ml
Apa distilata .....850.0 ml
pH final = 7.3+/- 0,2 .
Sterilizare prin autoclavare la 115°C, 15 min

Mediu BULION de SOIA TRIPTICAZA / 6.5% NaCl - este recomandat pentru diferentierea enterococilor, de streptococi din grupul D, are compozitia (g/l):

NaCl .....65,0 g
Cazeina peptona .....17.0 g
Fosfat dipotasic .....2.5 g
Peptona de soia .....3.0 g
Dextroza .....2.5 g
pH final = 7.3+/- 0.2
Sterilizare prin autoclavare la 115°C, 15 min

Mediu CARY – BLAIR – mediu semisolid de transport, pentru materii fecale (repartizat in coprocultoare), cu urmatoarea compozitie (g/500 ml):

Fosfat monoacid de sodiu .....1,1 g
Tioglicolat de sodiu.....1,5g
NaCl.....5 g
Clorura de calciu.....0,09g
Agar-agar.....5,6g
pH final = 8,4 +/- 0,2
Sterilizare prin fierbere (100°C), timp de 15 min

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Mediu – AGAR PSEUDOMONAS F SI AGAR PSEUDOMONAS P - este recomandat pentru diferentierea speciei *Pseudomonas aeruginosa* , bazata pe evidentierea fluorescentei (F Agar) si a piocianinei (P Agar) , cu formulele (g/l):

Pseudomonas F Agar:

Cazeina Peptona .....10.0 g
Peptona de carne .....10.0 g
Glicerol .....10.0 ml
Sulfat de magneziu .....1.5 g
Fosfat dipotasic .....1.5 g
Agar-agar.....15.0 g
pH final = 7,0+/- 0,2
Sterilizare la 121°C, 20 min

Pseudomonas P Agar:

Gelatina Peptona .....20.0 g
Sulfat de potasiu .....10.0 g
Glicerol .....10.0 ml
Clorura de Magneziu .....1.4 g
Agar –agar.....13.6 g
pH final = 7,0 +/- 0,2
Sterilizare prin autoclavare la 121°C, 20 min

Mediu BORDET- GENGOU – mediu solid selectiv pentru izolarea speciilor *Bordetella pertussis* si *B. parapertussis,* cu urmatoarea compozitie (g/l):

Infuzie de cartof.....4,5 g
Proteoza peptona.....10,0 g
NaCl.....5,5 g
Agar-agar.....16,0 g
pH final = 6,7 +/- 0,2
Sterilizare prin autoclavare la 121°C, timp de 15 min

Dupa racirea mediului la 40 – 50°C, se adauga 150 – 200 ml de sânge defibrinat de cal (incalzit la 37°C) si 40 mg cephalexin (substanta pura, rehidratata - solutie sterila).

Mediu BGN (**B**ulion pentru **G**ram **n**egativi - este recomandat pentru cresterea selectiva a bacililor Gram - negativi , are compozitia:

Cazeina peptona.....10.0 g
Peptona .....10.0 g
NaCl .....5.0 g
Citrat de sodiu .....5.0 g
Fosfat dipotasic .....4.0 g
D-Manitol .....2.0 g
Dextroza.....1.0 g
Fosfat monopotasic.....1.5 g
Dezoxicolat de sodiu.....0.5 g
pH final =7.0+/- 0.2. Incubare aeroba la 35-37°C , 18-24 h .
Sterilizare prin autoclavare la 115°C, timp de 30 min

Mediu BULION NUTRITIV, folosit pentru cultivarea unui numar mare de bacterii, are urmatoarea compozitie (g/l) :

Peptona.....10g
Extract de carne.....10g
NaCl.....5g
pH final = 7,2 – 7,4
Sterilizare prin autoclavare la 121°C, 20 min

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Peptona de soia .....10.0 g
Dextroza .....10.0 g
Agar-agar.....15.0 g
pH 6,5 +/- 0.2
Sterilizare prin autoclavare la 115° C, 15 min (se adauga apoi solutii de antibiotice, sterilizate prin filtrare) :
Cicloheximida.....400.0 mg
Cloramfenicol .....50.0 mg

Mediu Agar NITRAT – este recomandat pentru determinarea reducerii nitratilor de catre bacterii si are compozitia (g/l):

Peptona .....5.0 g
Extract de carne.....3.0 g
Nitrat de potasiu .....1.0 g
Agar-agar.....12.0 g
pH final = 6,8+/- 0,2
Sterilizare prin autoclavare la 121°C, 20 min

Mediu Agar PPLO cu inhibitori - mediu solid recomandat pentru izolarea speciilor de *Mycoplasma,* cu urmatoarea compozitie:

Infuzie din cord bovin ..... 50.0 g
Peptona .....10.0 g
NaCl .....5.0 g
Extract de drojdii 25% ..... 100.0 g
Acetat de talium ..... 0.25 g
Agar -agar.....14.0 g
Apa distilata .....700.0 ml.
pH final = 7,8+/- 0,2
Sterilizare prin autoclavare la 121 °C, 20 min ; apoi se adauga serul de cal si solutiile de antibiotice, sterilizate prin filtrare :
Ser de cal .....200.0 ml
Amfotericina B .....2.5 mg
Penicilina .....1 million U. I.

Mediu – AGAR PSEUDOMONAS CEPACIA (PC) - este recomandat pentru izolarea peciei *Psudomonas cepacia* (denumire actuala *Burkholderia cepacia).* are compozitia:

Acid piruvic 10%.....50.0 ml
Proteoza peptona .....1.0 g
Saruri biliare .....1.5 g
Cristal violet .....1.0 mg
Sulfat de amoniu .....1.0 g
Sulfat de magneziu .....0.2 g
Sulfat feros de amoniu.....0.01 g
Rosu fenol .....0.02 g
Agar-agar.....15.0 g
Tampon fosfat de potasiu .....950.0 ml.
pH final 6.2 +/- 0.1
Sterilizare prin autoclavare la 121°C; apoi se adauga antibioticele, sub forma de solutii sterile :
Ticarcilina.....0.1 g
Polimixina B .....300000 U

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Medii de cultura de uz microbiologic (retete)

Mediu cu ADN si albastru de toluidina - recomandat pentru identificarea speciilor de *Stafilococcus aureus* producatoare de DN-aza (termonucleaza). cu compozitia:

Acid deoxiribonucleic (ADN).....0.3 g
Clorura de calciu (0.01 M).....1.0 ml
NaCl.....10.0 g
Albastru de toluidina .....3.0 ml
Agar-agar .....10.0 g
TRIS tampon.....1000.0 ml
Sterilizare prin autoclavare la 115°C, 30 min
Incubare la 35-37°C, 2 h.

Mediu Agar AMIDON - este recomandat pentru identificarea Actinomycetelor aerobe, are urmatoarea compozitie (g/l):

Extract de carne .....3.0 g
Gelatina Peptona .....5.0 g
Agar-agar.....15.0 g
Amidon de cartof .....10.0 g
pH final = 7.3 +/- 0.2
Sterilizare prin autoclavare la 121°C, 15 min

Mediu Agar CETRIMID - – recomandat pentru procedeele calitative de izolare selectiva si identificare prezumtiva a speciei *Pseudomonas aeruginosas* (stimuleaza pigmentogeneza, iar cetrimidul inhiba dezvoltarea altor bacterii ; are urmatoarea formula (g/l):

Peptona.....20.0 g
Sulfat de potasiu .....10.0 g
Glicerol.....10.0 g
Clorura de magneziu..... 1.4 g
Fosfat monopotasic.....1.0 g
Cetrimid.....0.3 g
Agar-agar.....13.0 g
pH final = 7.2 +/- 0.2
Sterilizare prin autoclavare la 121°C, 20 min

Mediu Agar CHOCOLAT – recomandat pentru izolarea si cultivarea speciilor de *Neisseria* si *Haemophilus*, cu urmatoarea formula:

Cazeina peptona.....7.5 g
Peptona ....7.5 g
Amidon de porumb .....1.0 g
Fosfat dipotasic.....4.0 g
Fosfat monopotasic.....1.0 g
Hemoglobina.....10.0 g
GCHI (supliment).....10.0 ml
NaCl.....5.0 g
Agar-agar.....10.0 g
pH final = 7.2 +/- 0.2
Sterilizare prin autoclavare la 121°C, 15 min

Mediu Agar MICOBIOTIC - este recomandat pentru izolarea microfungilor patogeni din probele clinice, care pot fi contaminate cu bacterii si fungi saprotrofi; are compozitia (g/l):

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabel nr. 14. **Caracterele morfologice si biochimice ale unor specii de levuri ale genului *Candida*, de importanta medicala**

Specia	TESTE DE FERMENTATIE								TESTE DE ASIMILATIE																			Celule vegetative (forma si dimensiuni)
	D-Glucoza	D- Galactoza	Zaharoza	Maltoza	Celobioza	Trehaloza	Lactoza	Rafinoza	D-Glucoza	D-Galactoza	L-Sorboza	Zaharoza	Maltoza	Celobioza	Trehaloza	Lactoza	Melobioza	Rafinoza	Melezitoza	D-Xiloza	L- Arabinoza	Eritritol	Ribitol	D- Manitol	Metil α-D-glucozid	Inozzitol	Nitrat	
C. albicans	+	v	-	+	-	v	-	-	+	+	v	+	+	v	+	-	-	-	v	+	v	-	v	+	v	-	-	Globular-ovoidale, 3,5 - 6 x 6 – 10 µm
C.guilliermondii	+	v	v	-	-	v	-	v	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	v	+	+	-	+	+	+	-	-	Ovoidale, 2 – 4,5 x 2,5 – 7 µm
C. krusei	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ovoidal-cilindrice, 3 – 5 x 6 – 20 µm
C. lipolytica	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	v	-	v	v	-	-	-	-	-	-	-	+	-	v	-	-	-	Ovoidal-cilindrice, 3 – 5 x 5 – 11 µm
C. lusitaniae	+	+	v	-	+	v	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	v	-	+	+	v	-	-	Globular-ovoidale, 1,5– 6x 2,5–10 µm
C. macedoniensis	+	+	+	-	-	-	-	v	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	v	v	-	-	-	Ovoidale, 2,5 – 6 x 4,5 - 9 µm
C.membranifaciens	v	v	v	-	-	v	-	v	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	Globular-ovoidale, 3 – 6 x 3,5 – 7 µm
C. parapsilosis	+	v	-	-	-	-	-	-	+	+	v	+	+	-	+	-	-	-	+	+	v	-	+	+	+	-	-	Ovoidale, 2,5 – 4 x 2,5 – 9 µm
C.pseudotropicalis	+	+	+	-	-	-	+	v	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	v	-	-	-	Ovoidale, 2,5 – 5 x 5 – 10 µm
C. stellatoidea	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	v	-	-	+	v	-	-	Ovoidale, 4 – 8 x 5- 10 µm
C. tropicalis	+	v	+	+	-	v	-	-	+	+	v	+	+	v	+	-	-	-	+	+	v	-	+	+	+	-	-	Globular-ovoidale, 4 – 8 x 5 – 11 µm
C. zeylanoides	v	-	- -	-	-	-	-	-	+	v	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	v	+	-	-	-	Ovoidale, 1,5 – 5 x 4 – 10 µm

Caractere: (+) = pozitiv; (-) = negativ; v = variabil.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabel nr.13. Rezultatele testelor biochimice (exprimate in % de reactii pozitive ale tulpinilor fiecarei specii, apreciate dupa 24-48 ore de incubare la 37°C) caracteristice speciilor de *Enterobacteriaceae* care sunt cel mai frecvent izolate din probele clinice

VERIFICAT 2017

Specii	Producere de Indol	Testul Rosu-metil	Reactia Voges-Proskauer	Utilizare citrat (Simmons)	H_2S (TSI)	Hidroliza Uree	Fenilalanin-deaminaza	Lizin-decarboxilaza	Arginin- decarboxilaza	Ornitin-decarboxilaza	Mobilitate (36°C)	Hidroliza Gelatinei (22°C)	D-Glucoza, Gaz	Fermentare Lactoza	Fermentare Sucroza	Fermentare D-Manitol	Fermentare Dulcitol	Fermentare Adonitol	Fermentare D-Sorbitol	Fermentare L-Arabinoza	Fermentare Rafinoza	Fermentare L-Ramnoza	Fermentare D-Xiloza	Fermentare Melobioza	Dnaza, 25°C	ONPG*
Escherichia coli	98	99	0	1	1	1	0	90	17	65	95	0	95	95	50	98	60	5	94	99	50	80	95	75	0	95
Shigella serogr. A, B, C	50	100	0	0	0	0	0	0	5	1	0	0	2	0	0	93	2	0	30	60	50	5	2	50	0	2
Shigella sonnei	0	100	0	0	0	0	0	0	2	98	0	0	0	2	1	99	0	0	2	95	3	75	2	25	0	90
Salmonella, majoritatea erotipurilor	1	100	0	95	95	1	0	98	70	97	95	0	96	1	1	100	96	0	95	99	2	95	97	95	2	2
Salmonella typhi	0	100	0	0	97	0	0	98	3	0	97	0	0	1	0	100	0	0	99	2	0	0	82	100	0	0
Salmonella paratyphi A	0	100	0	0	10	0	0	0	15	95	95	0	99	0	0	100	90	0	95	100	0	100	0	95	0	0
Citrobacter freundii	5	100	0	95	80	70	0	0	65	20	95	0	95	50	30	99	55	0	98	100	30	99	99	50	0	95
Citrobacter diversus	99	100	0	99	0	75	0	0	65	99	95	0	98	35	45	100	50	98	99	100	0	100	100	0	0	96
Klebsiella pneumoniae	0	10	98	98	0	95	0	98	0	0	0	0	97	98	99	99	30	90	99	99	99	99	99	99	0	99
Klebsiella oxytoca	99	20	95	95	0	90	1	99	0	0	0	0	97	100	100	99	55	99	99	98	100	100	100	99	0	100
Enterobacter aerogenes	0	5	98	95	0	2	0	98	0	98	97	0	100	95	100	100	5	98	100	100	96	99	100	99	0	100
Enterobacter cloacae	0	5	100	100	0	65	0	0	97	96	95	0	100	93	97	100	15	25	95	100	97	92	99	90	0	99
Hafnia alvei	0	40	85	10	0	4	0	100	6	98	85	0	98	5	10	99	0	0	0	95	2	97	98	0	0	90
Serratia marcescens	1	20	98	98	0	15	0	99	0	99	97	90	55	2	99	99	0	40	99	0	2	0	7	0	98	95
Proteus mirabilis	2	97	50	65	98	98	98	0	0	99	95	90	96	2	15	0	0	0	0	0	1	1	98	0	50	0
Proteus vulgaris	98	95	0	15	95	95	99	0	0	0	95	91	85	2	97	0	0	0	0	0	1	5	95	0	80	1
Providencia rettgeri	99	93	0	95	0	98	98	0	0	0	94	0	10	5	15	100	0	100	1	0	5	70	10	5	0	5
Providencia stuartii	98	100	0	93	0	30	95	0	0	0	85	0	0	2	50	10	0	5	1	1	7	0	7	0	10	10
P. alcalifaciens	99	99	0	98	0	0	98	0	0	1	96	0	85	0	15	2	0	98	1	1	1	0	1	0	0	1
Morganella morganii	98	97	0	0	5	98	95	0	0	98	95	0	90	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
Yersinia enterocolitica	50	97	2	0	0	75	0	0	0	95	2	0	5	5	95	98	0	0	99	98	5	1	70	1	5	95
Yersinia pestis	0	80	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	97	0	0	50	100	0	1	90	20	0	50
Y. pseudotuberculosis	0	100	0	0	0	95	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	50	15	70	100	70	0	70

*ONPG – o-nitrofenil-β-D-galactopiranozid

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tiparul s-a executat sub c-da 822/2001 la
Tipografia Editurii Universității din București

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

DATA RESTITUIRII		
- 2 MAR. 2012		
2 7 APR. 2012		
0 9 IUN. 2012		
—		
2 2 MAR. 2013		
1 6 MAI 2013		
—		
0 6 FEB. 2014		
0 7 MAR. 2014		
—		
2 0 OCT. 2014		
—		

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

BIBLIOTECA CENTRALA
UNIVERSITARA „CAROL I"

DE SPIRITU ET ANIMA

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro